



**RODRIGO DA SILVA ALVES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA ENTRE ÓLEOS  
ESSENCIAIS OBTIDOS DE FOLHAS DE  
MANJERICÃO, PIMENTA DE MACACO E  
TOMILHO SOBRE PATÓGENOS VEICULADOS  
POR ALIMENTOS**

**LAVRAS - MG  
2010**

**RODRIGO DA SILVA ALVES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ENTRE ÓLEOS  
ESSENCIAIS OBTIDOS DE FOLHAS DE MANJERICAO, PIMENTA DE  
MACACO E TOMILHO SOBRE PATÓGENOS VEICULADOS POR  
ALIMENTOS**

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

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

Co-orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG**

**2010**

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

Alves, Rodrigo da Silva.

Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjerição, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados por alimentos / Rodrigo da Silva Alves. – Lavras : UFLA, 2010.

71 p. : il.

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

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Microbiologia de alimentos. 2. Sinergismo. 3. Antagonismo. 4. Produtos naturais em alimentos. 5. Toxinfecção alimentar. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.07

**RODRIGO DA SILVA ALVES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA ENTRE ÓLEOS  
ESSENCIAIS OBTIDOS DE FOLHAS DE MANJERICÃO, PIMENTA DE  
MACACO E TOMILHO SOBRE PATÓGENOS VEICULADOS POR  
ALIMENTOS**

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

APROVADA em 23 de agosto de 2010

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

IFMG/BambuÍ

Dra. Maria das Graças Cardoso

Orientadora

**LAVRAS – MG  
2010**

À todos aqueles que se envolveram e me ajudaram a trilhar esse caminho,  
E àqueles que mantiveram orações.

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte e origem de todo bem, agradeço por me permitir trabalhar e de forma sublime alcançar cada objetivo.

A Beatriz, minha mãe, meu espelho, meu exemplo e minha fonte de inspiração.

Tenho sorte em ter você.

Ao João Alves (*in memoriam*), meu pai, meu conselho e exemplo de hombridade, sentem não estar aqui.

Ao Ricardo, meu irmão, a Joelma e Karoline minhas cunhadas por acreditarem e me incentivarem.

Aos meus Sobrinhos João e Pedro por tornarem mais divertido os momentos mais árduos.

A Ana Beatriz, pelas noites perdidas, pelos intermináveis finais de semana de trabalho e por acreditar em mim mais que eu mesmo. Te amo.

A Mariana e Nathália, grandes amigas, pelas madrugadas no laboratório pelos sanduíches gigantes, e pelo apoio físico e espiritual, sem vocês não seria possível concluir.

Aos amigos Cris, João, Dayana e Carlos, por me acolherem e respeitarem meus momentos de exclusão.

A grande amiga Inayara, por todas as horas dedicadas a mim, por todos os conselhos e por acima de tudo acreditar que conseguiria.

A todos os amigos da Unifenas, em especial a Raquel e Vanessas, pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado.

A minha querida Orientadora Prof. Graça, por ser fonte de conhecimento e profissionalismo, por me acolher e me dar a oportunidade de atingir mais um desejo. Você me mostrou o melhor caminho entre pedras e espinhos.

A minha co-orientadora Prof. Roberta pelo apoio, pelo sorriso fácil e carinho dispensado.

A prof<sup>a</sup> Ana Cardoso, incentivadora inicial deste sonho, agradeço por tornar  
simples as situações mais complicadas

Aos amigos da UFLA, em especial laboratório de Fitoquímica, Cachaça e  
Microbiologia de Alimentos, por me estenderem as mãos e me acolherem de  
forma tão afetuosa.

“A ciência não pode prever o que vai acontecer. Só pode prever a probabilidade de algo acontecer. Onde termina o limite estreito de alcance da ciência, aí começa o horizonte infinito da fé”.

César Lattes e Prof. Felipe Aquino.

## RESUMO

Foram estudados o potencial antimicrobiano e os efeitos sinérgicos exercidos pelos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e pimenta de macaco (*Piper aduncum*) obtidos pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado durante 2 horas sobre microrganismos de toxinfecção alimentar (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). Os óleos essenciais foram caracterizados e quantificados quimicamente por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas GC/MS da marca Shimadzu. O presente trabalho foi constituído de dois ensaios biológicos. No primeiro os óleos essenciais foram submetidos a avaliação microbiana separadamente e no segundo selecionaram-se quatro concentrações, uma controle, uma mínima, uma média e uma alta de acordo com o comportamento de cada óleo, combinando-as entre si, obtendo-se sessenta e quatro tratamentos para cada microrganismo. Para todos os ensaios de atividade antimicrobiana isoladas ou de sinergismo foram adotadas 10 µL de cada óleo essencial ou solução de óleos essenciais em meio contendo 10<sup>8</sup> UFC de cada microrganismo por mL de meio. Observou-se uma maior eficiência para o óleo essencial de tomilho e uma menor atividade para o óleo essencial de pimenta de macaco, uma vez que este apresentou halos menores de inibição. Observou-se que para *Salmonella enteritidis* os óleos apresentaram efeitos antagônicos, pois quando aplicados conjuntamente notou-se a redução dos halos de inibição. Já para a *E. coli* o efeito mostrou-se sinérgico para concentrações mais baixas e antagônico a medida que se aumentava a concentração dos demais óleos. Este estudo mostra que os óleos essenciais podem ser uma alternativa como antimicrobianos naturais, porém é necessário empenhar-se quanto a utilização conjunta uma vez que os mesmos podem ter sua ação potencializada ou minimizada.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Sinergismo. Antagonismo. Toxinfecção alimentar.

## ABSTRACT

We studied the antimicrobial activity and the synergistic effects exerted by the essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum*) and monkey pepper (*Piper aduncum*) obtained by hydrodistillation process in modified Clevenger apparatus for 2 hours on poisoning microorganisms food (*Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). The essential oils were characterized chemically and quantified by gas chromatography coupled with mass spectrometry GC/MS Shimadzu. This study consisted of two biological assays. At first the essential oils were subjected to microbial assessment separately and in the second we selected four concentrations, control, minimum, average and high according to the behavior of oil each, combining them together, obtaining sixty and four treatments for each microorganism. For the tests of antimicrobial activity isolated or synergism were adopted 10  $\mu$ L of each essential oil or solution of essential oils in a medium containing  $10^8$  CFU of each microorganism/mL media. Was observed to greater efficiency for the essential oil of thyme and a lower activity for the essential oil of pepper jack, since it showed less inhibition halos. Was observed that the oils exhibited antagonistic effects to *Salmonella enteritidis*, when applied together because we noticed a reduction of inhibition zones. As for the *E. coli* showed the effect is synergistic to lower concentrations and antagonistic in proportion as they increased the concentration of the remaining oils. This study shows that essential oils can be a natural alternative to antibiotics, but it is necessary to engage as the joint use since they may have their action enhanced or minimized.

Keywords: Essential oils. Synergism. Antagonism. Food poisoning.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formação de metabólitos secundários nos vegetais.....	20
Figura 2	Estrutura química do dilapiol.....	23
Figura 3	Estrutura química do (a) Eugenol, (b) Linalol; (c) Geraniol e (d) Cinamato de metila.....	24
Figura 4	Estruturas químicas do (a) carvacrol e (b) timol.....	26
Figura 5	Superfície de resposta para halos de inibição expressos em mm das combinações de óleos essenciais contra <i>E. coli</i> .....	51
Figura 6	Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco combinados contra <i>E. coli</i> – (a) tratamentos 1 a 8, (b) tratamentos 9 a 16, (c) tratamentos 17 a 24 e (d) tratamentos 25 a 32.....	54
Figura 7	Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco combinados contra <i>E. coli</i> – (e) tratamentos 33 a 40, (f) tratamentos 41 a 48, (g) tratamentos 49 a 56 e (h) tratamentos 57 a 64.....	55
Figura 8	Superfície de resposta para halos de inibição expressos em mm das combinações de óleos essenciais contra <i>Salmonella enteritidis</i> .....	57
Figura 9	Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco combinados contra <i>Samonella enteritidis</i> – (a) tratamentos 1 a 8 e (b) tratamentos 9 a 16.....	59
Figura 10	Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco combinados contra <i>Samonella enteritidis</i> – (c) tratamentos 17 a 24, (d) tratamentos 25 a 32, (e) tratamentos 33 a 40, (f) tratamentos 41 a 48, (g) tratamentos 49 a 56 e (h) tratamentos 57 a 64.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rendimentos dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação expressos em % m/m de material vegetal fresco.....	40
Tabela 2	Componentes químicos caracterizados e quantificados no óleo essencial de tomilho por GC-MS .....	43
Tabela 3	Componentes químicos caracterizados e quantificados no óleo essencial de manjeriço por GC-MS .....	44
Tabela 4	Componentes químicos caracterizados e quantificados no óleo essencial de pimenta de macaco por GC-MS .....	45
Tabela 5	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de manjeriço ( <i>Ocimum basilicum</i> L.) – halos de inibição (mm) para microrganismos em estudo.....	47
Tabela 6	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> ) – halos de inibição (mm) para microrganismos em estudo.....	48
Tabela 7	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de pimenta de macaco ( <i>Piper Aduncum</i> L.) – halos de inibição (mm) para microrganismos em estudo.....	49
Tabela 8	Porcentagem de óleos essenciais para os tratamentos e média de halos da atividade antimicrobiana frente à <i>E. coli</i> .....	50
Tabela 9	Porcentagem de óleos essenciais para os tratamentos e média de halos da atividade antimicrobiana frente à <i>Salmonella enteritidis</i> .....	56
Tabela 10	Desdobramento entre a concentração de óleo essencial de manjeriço e tamanho dos halos de inibição (mm) para <i>S. aureus</i> .....	61
Tabela 11	Desdobramento entre a concentração de óleo essencial de tomilho e tamanho dos halos de inibição (mm) para <i>S. aureus</i> ....	61

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Plantas aromáticas, condimentares e medicinais</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Óleos essenciais</b> .....	18
<b>2.3</b>	<b>Óleos essenciais e a indústria de alimentos</b> .....	20
<b>2.3.1</b>	<b>Pimenta de macaco (<i>Piper aduncum L.</i>)</b> .....	22
<b>2.3.2</b>	<b>Manjeriço (<i>Ocimum basilicum L.</i>)</b> .....	23
<b>2.3.3</b>	<b>Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)</b> .....	25
<b>2.4</b>	<b>Microrganismos envolvidos em toxinfecção alimentar</b> .....	26
<b>2.4.1</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	27
<b>2.4.2</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b> .....	28
<b>2.4.3</b>	<b><i>Salmonella sp.</i></b> .....	30
<b>2.5</b>	<b>Ação antimicrobiana de óleos essenciais</b> .....	31
<b>2.6</b>	<b>Interação entre óleos essenciais</b> .....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
<b>3.1</b>	<b>Obtenção dos óleos essenciais</b> .....	35
<b>3.1.1</b>	<b>Coleta do material vegetal</b> .....	35
<b>3.1.2</b>	<b>Extração dos óleos essenciais</b> .....	35
<b>3.1.3</b>	<b>Determinação da umidade</b> .....	35
<b>3.2</b>	<b>Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais</b> .....	36
<b>3.3</b>	<b>Atividade antimicrobiana de óleos essenciais</b> .....	37
<b>3.3.1</b>	<b>Padronização, estocagem e preparação do inóculo</b> .....	37
<b>3.3.2</b>	<b>Atividade antimicrobiana</b> .....	38
<b>3.3.3</b>	<b>Ensaio de interação entre óleos essenciais</b> .....	39
<b>3.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>4.1</b>	<b>Rendimento de óleos essenciais</b> .....	40
<b>4.2</b>	<b>Atividade antimicrobiana de óleos essenciais</b> .....	41
<b>4.2.1</b>	<b>Principais componentes químicos e mecanismo de ação antimicrobiana</b> .....	41
<b>4.2.2</b>	<b>Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i>) para os microrganismos em estudo</b> .....	46

4.2.3	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho ( <i>Thymus vulgaris</i> ) para microrganismos em estudo .....	47
4.2.4	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta de macaco ( <i>Piper aduncum</i> ) para microrganismos em estudo .....	48
4.3	Atividade antimicrobiana entre as misturas dos óleos essenciais ...	49
4.3.1	Atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho, manjerição e pimenta de macaco sobre <i>E. coli</i> .....	49
4.3.2	Atividade antimicrobiana sinérgica de óleo essencial de tomilho, manjerição e pimenta de macaco frente à <i>Salmonella enteritidis</i> . ...	55
4.3.3	Atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho, manjerição e pimenta de macaco frente à <i>S. aureus</i> .....	61
5	CONCLUSÃO .....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Óleos essenciais são líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, de fácil volatilidade e aromas agradáveis, normalmente conhecidos como essências. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, sendo que alguns, devido à presença de azulenos e derivados destes, apresentam a coloração azulada, como o óleo de camomila e mil folhas.

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas, sua constituição química baseia-se principalmente de compostos terpênicos. Podem estar armazenados em diversos órgãos vegetais, tais como flores, folhas ou ainda nas cascas dos caules, madeiras, raízes, rizomas, frutos ou sementes (SIMÕES, 2007).

Estas substâncias voláteis são encontradas em várias plantas que possuem como características básicas o cheiro e o sabor. Possuem baixa miscibilidade em água, mas alta solubilidade em solventes orgânicos, sendo extraídos por técnicas simples como arraste de vapor ou hidrodestilação. Embora sejam pouco solúveis em água, conseguem conferir odor à mesma, constituindo os hidrolatos e tornando-se fonte importante de aromatizantes em perfumaria e especiarias. Além do mais, as essências ou óleos essenciais apresentam atividades farmacológicas, como anti-sépticas, antiinflamatórias, antimicrobianas entre outras, que são muito utilizadas na medicina popular e na fabricação de medicamentos.

Apresentam grande importância econômica, sendo largamente empregados na indústria química, perfumaria, farmacologia, inseticidas, fungicidas, alimentos, bebidas, anti-séptico, estimulantes, etc. Por esta razão, embora ainda de forma lenta, é crescente o número de estudos sobre a composição química e propriedades biológicas, bem como os fatores

taxonômicos, ambientais e de cultivo que levam à variação tanto na quantidade como na qualidade dessas essências.

O Brasil é considerado um grande produtor e exportador de óleos essenciais e de alguns de seus componentes puros, sendo que as essências mais produzidas são as cítricas, menta, eucalipto, gerânio, citronela, vetiver, pau rosa e cravo (PIMENTEL et al., 2008).

Os óleos essenciais mostram-se eficientes no controle do crescimento de ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Usos práticos dessas atividades são sugeridos na indústria de alimentos. Essa propriedade antimicrobiana tem sido reconhecida empiricamente durante séculos, mas recente foram confirmadas cientificamente. Por outro lado, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (DUARTE, 2006).

O Brasil possui em sua culinária grande variedade de condimentos empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Além dessa utilidade, os condimentos possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. As propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de microrganismos patogênicos presentes em alimentos. Vários estudos apontam os óleos essenciais como componentes da planta de onde se originam os princípios ativos capazes de combater microrganismos de toxinfecções alimentares.

Os grupamentos alcoóis, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos presentes nos óleos essenciais podem explicar sua ação bacteriostática e/ou bactericida. Frente a esta observação a aplicação de óleos essenciais de diferentes condimentos podem apresentar sinergicamente efeito inibitório maior quanto aplicados a microrganismos de origem alimentar (NOVACOSK; TORRES 2006).

Considera-se o estudo sobre toxinoses alimentares um fator preponderante para economia e desenvolvimento de um país uma vez que o consumo de alimentos contaminados é responsável por baixas econômicas no setor de saúde e mortalidade principalmente em crianças de 0 a 5 anos. Estima-se que cerca de 1,5 bilhões de casos de gastroenterocolite ou simplesmente GECA ocorram anualmente em todo o mundo e cerca de 70% promovem de alimentos com presença de bactérias, vírus, protozoários e parasitas. O desfecho é trágico uma vez que cerca de 5 milhões de crianças com faixa etária inferior a 5 anos morrem em função da diarreia em todo o mundo.

No Brasil supõe-se que o baixo número de notificações de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos) é devido a casos negligenciados, pois os sintomas desenvolvidos são normalmente tratados sem consulta ou intervenção médica ou confundidos com outras patologias como gripes, estresse dentre outras. Este cenário repete-se em todo mundo uma vez que cerca de 10% da população adulta procura tratamento médico e destes apenas 20% são submetidos a exames de coprocultura ou pesquisa de vírus.

Nos Estados Unidos verifica-se cerca de 33 milhões de casos por ano de toxinfecções alimentares já no Reino Unido, ocorrem 35.000 internações hospitalares para tratamento da DTAs.

Em face do exposto, o presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de três condimentos populares, isolados e/ou em misturas sobre patógenos envolvidos em toxinfecções alimentares, bem como identificar e quantificar as substâncias químicas presentes nos óleos essenciais das plantas condimentares.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

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

Condimentos e especiarias podem ser definidos como substâncias aromáticas de origem vegetal empregadas para conferir sabor e aroma aos alimentos. Cerca de 70 condimentos diferentes são cultivados e utilizados em todo mundo (SHELEF, 1983).

Existe hoje uma teoria, bastante plausível, de que o hábito de utilizar e apreciar condimentos do tipo especiarias ou ervas aromáticas teria sido transmitido genética e culturalmente, através de gerações e está relacionado com a atividade antimicrobiana da maior parte dessas substâncias. Em regiões do globo onde as condições climáticas são mais propício ao desenvolvimento de microrganismos nos alimentos, esses condimentos tiveram papel importante na preservação da espécie humana evitando infecções causadoras de doença, principalmente nos tempos em que a tecnologia que empregava frio como forma de conservação ainda estava bem distante (GUERREIRO; DIAS, 1999). Um exemplo da empregabilidade de condimentos está na civilização egípcia. Sabe-se que na construção das pirâmides antigas foram necessários milhares de homens e que estes estavam susceptíveis a desintérias, cólera e tifo devido as condições higiênicas, uma solução encontrada para combater tais enfermidades consistia numa alimentação rica em ervas e alho.

Nos países do Norte da Europa, o uso de ervas aromáticas e especiarias são bem menos utilizadas, devido a condição climática dessa região do mundo (GUERREIRO; DIAS, 1999).

A utilização de condimentos naturais, de origem vegetal, torna o alimento mais atrativo ao consumidor por não apresentarem efeito tóxico,

mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas, além de proporcionar benefícios à saúde (BARA, 1992).

Das plantas aromáticas é possível extrair substâncias químicas que além de conservar, possibilitam maior segurança ao alimento, minimizando a veiculação de microrganismos patogênicos. Sendo assim os componentes da Biodiversidade vegetal podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica e para saúde (SIMÕES et al., 2007).

Um grande número de espécies de plantas aromáticas, condimentares ou medicinais normalmente é dotado de quantidades significativas de óleos essenciais, sendo estes os principais agentes protetores da planta e largamente empregados na indústria de alimentos devido ao grande efeito biológico promovido (SIMÕES et al., 2007).

Dentre as espécies que apresentam ação antimicrobiana distingui-se aquelas com ação contra bactérias gram positivas e gram negativas sendo as espécies *Allium sativum*, *Armoracia rusticana*, *Caryopteris*, *Hyssopus officinalis*, *Mentha x villosa*, *Nepeta x faassenii*, *Ocimum basilicum* var. *grant verte*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Satureja montana*, *Thymus pulegioides*, *Thymus serpyllum* largamente citadas.

## 2.2 Óleos essenciais

O metabolismo vegetal consiste num conjunto de reações químicas que ocorrem nas células por meio de enzimas específicas que garantem e definem a direção destas reações. O produto dessas reações são chamados metabólitos e podem ser divididos em metabólitos primários e secundários (SIMÕES et al., 2007).

Os produtos secundários têm papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, contribuindo para que as mesmas possam ter boa interação

com os diferentes ecossistemas (AERTS et al., 1991; HARBORNE, 1999). Estes componentes aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas como, antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentar atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (LI et al., 1993).

Durante muito tempo, acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, simplesmente como produtos finais das reações, chegando a ser considerados como anomalias. Essa visão mudou radicalmente e a cada dia descobre-se um pouco mais sobre a função desses compostos, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais, metabólitos secundários, são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética. Podem ser formados partindo do chiquimato tendo como precursor os fenilpropanóides (Figura 1), ou pela via do acetato, tendo como precursor o isopreno.

A função dos compostos fenólicos está relacionada com a síntese das ligninas que são comuns a todas as plantas superiores, atrativos aos seres humanos devido ao odor, sabor e coloração agradáveis, mas também para outros animais, os quais são atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Além disso, esse grupo de compostos é importante para proteger as plantas contra os raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

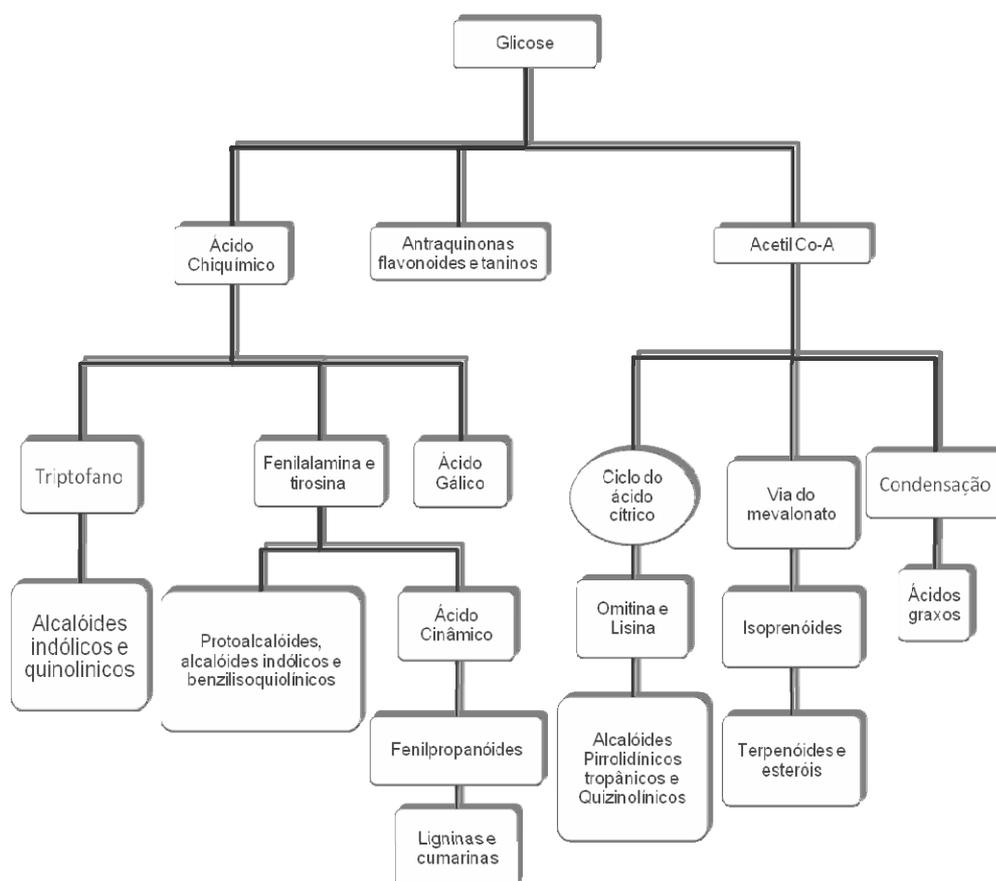


Figura 1 Formação de metabólitos secundários nos vegetais  
Fonte: Simões (2007)

### 2.3 Óleos essenciais e a indústria alimentícia

A utilização de óleos essenciais como aromatizantes naturais a muito é explorada pela indústria de alimentos, porém a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e a busca por alternativas naturais para combater os microrganismos deterioradores e patogênicos tem assumido papel relevante no emprego dessas substâncias (ELGAYYAR et al., 2001; DORMAN; DEANS, 2000). Contudo para criar o real efeito antimicrobiano de conservação ou de

proteção contra agentes patógenos, grandes concentrações de óleos essenciais são normalmente exigidas, causando no alimento alterações sensoriais, tornando assim o emprego de óleos essenciais inviável (HSIEH; MAU; HUANG, 2001; NAZER et al., 2005).

Uma alternativa para esse problema pode estar associada à combinação de óleos essenciais, minimizando o efeito sensorial causado. Um óleo essencial que não apresenta relevante ação antimicrobiana quando associado a outro óleo de maior poder antisséptico pode potencializá-lo, tornando-o um interessante agente antimicrobiano natural, e proporcionando a indústria de alimentos o seu emprego em escalas seguras e efetivas (ULTEE et al., 2000).

A grande empregabilidade de especiarias na indústria de alimentos especialmente vinculada a agentes antibacterianos é atribuída basicamente a duas razões: à constante discussão e questionamentos sobre a utilização de segurança dos aditivos químicos, havendo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas, e a redução do sal ou do açúcar em alimentos por razões dietéticas o que aumenta o uso de outros temperos (ISMAIEL; PIERSON, 1990).

Devido à grande diversidade botânica do Brasil e graças ao um mercado promissor da indústria de alimentos, o país tem se tornado chave no cenário do comércio de óleos essenciais ao lado de China, Índia e Indonésia. Segundo Bizzo, Howell e Rezende (2009), o Brasil até já ocupou posição de melhor destaque neste ramo, exportando óleo de pau-rosa, sassafrás e menta, porém para os dois últimos passou nos últimos anos à condição de importador. Para esse autor, os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são Estados Unidos da América (EUA) 40% e União Européia (UE) sendo a França o país de destaque 30% e Japão 7%, estes movimentaram aproximadamente US\$ 15 milhões por ano com previsão de crescimento para o setor de 11 %. Estes óleos essenciais são destinados na grande maioria à indústria alimentícia. Como

forneecedor de óleos essenciais destaca-se o Brasil como ocupante de uma posição intermediária perdendo para China, Índia, Argentina, EUA e França. Observando esse panorama mundial verifica-se que o Brasil pode ocupar um papel de maior destaque neste cenário e para isso necessita-se maior apoio ao setor de produção e pesquisa em óleos essenciais.

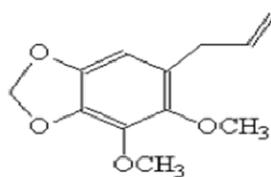
### 2.3.1 Pimenta de macaco (*Piper aduncum* L.)

A espécie *Piper aduncum* L. é uma planta aromática da família Piperaceae que ocorre naturalmente na Amazônia (MOTA et al., 2001). Conhecida vulgarmente como pimenta-de-macaco, recebe outros nomes como Aperta-Ruão, Aperta-João, Jaborandi do Mato, Pimenta do Fruto Gancho.

A planta apresenta estrutura rústica, normalmente de pequeno porte, que tem floração característica, apresenta também arbusto com ramos pubescentes de folhas com pecíolo de 0,2 a 0,4 cm de comprimento, sem bainha; folhas elípticas ou lanceoladas com aproximadamente 20 cm de comprimento; 7 cm de largura; ápice acuminado e base redonda ou cordulata; áspera na face ventral e pubescente nas faces dorsal e ventral; espigas regularmente curvadas, de tamanho semelhante ao das folhas com pedúnculos curtos; bractéolas pedicelado-peltadas, com pelta provida de pêlos; quatro estames e três estigmas sésseis (SILVA; OLIVEIRA 2000).

No gênero *Piper*, os constituintes químicos mais comuns são as amidas, destacando-se as isobutilamidas, piperidina e pirrolidina. *Piper aduncum* produz óleo essencial com grande potencial de exploração, uma vez que possui comprovada ação sobre fitopatógenos de culturas tradicionais, como fungos (BASTOS; ALBUQUERQUE, 1997), bactérias (ORJALA et al., 1993), além de comprovada ação analgésica e antiinflamatória com baixos níveis de toxicidade (MONTEIRO et al., 2001).

O dilapiol (Figura 2) aparece como constituinte principal no óleo essencial de *P. aduncum* variando de 58% a 88,4%. Este componente majoritário do óleo essencial da pimenta-de-macaco é um éter fenílico que vem sendo testado com êxito como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida com a vantagem de ser um produto biodegradável (BASTOS; ALBUQUERQUE, 1997).



Dilapiol

Figura 2 Estrutura química do dilapiol  
Fonte: Fazolin et al. (2005)

### 2.3.2 Manjeriço (*Ocimum basilicum* L)

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) pertence à família Lamiaceae, possuindo entre 50 e 150 espécies na Ásia Tropical, África, América Central e América do Sul.

É uma planta herbácea anual, de polinização cruzada, resultando em grande número de sub-espécies, variedades e formas. Muito ramificada, aromática e perfumada; atinge 0,5 a 1m de altura. Possui haste reta com muitas folhas carnosas, ovaladas, sem pêlos e de cor verde brilhante. Na face inferior das folhas existem minúsculas covas, onde se formam gotículas de essências. Suas flores são brancas ou avermelhadas, formando espigas e seus frutos são aquênios (PINTO; SANTIAGO 2000).

O teor de óleo essencial contido nesta planta encontra-se na faixa entre 1,5 e 3% (p/p), dependendo da região geográfica e da espécie. Normalmente, há

variações consideráveis entre os constituintes majoritários de uma espécie para outra, principalmente pelo fato dos componentes do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. serem produzidos por duas rotas bioquímicas diferentes: rota do ácido chiquímico e rota do ácido mevalônico. Na primeira rota, os maiores constituintes da espécie são: eugenol e cinamato de metila, enquanto que na segunda os componentes majoritários são linalol e geraniol, ilustrados na Figura 3 (MAZUTTI, 2006).

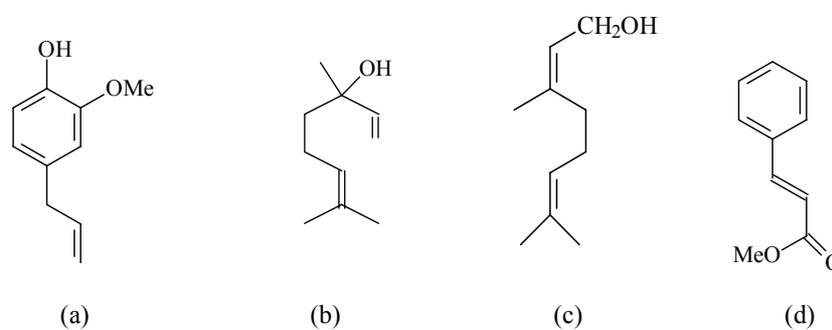


Figura 3 Estruturas químicas (a) Eugenol, (b) Linalol; (c) Geraniol e (d) Cinamato de metila.

Fonte: Simões (2007)

O linalol tem sido largamente testado como acaricida (PRATES et al., 1998), bactericida e fungicida (BELAICHE; TANTAOUI-ELARAKI; IBRAHIMY, 1995).

Segundo Fernandes et al. (2004), o manjeriço apresenta grande variedade de substâncias químicas, sendo o linalol o componente majoritário. Nas espécies estudadas pelos autores acima, os teores de linalol prevaleceram tanto na espécie de folha estreita (44,3% a 59,8%) quanto na de folha larga (22,7% a 37,4%).

Também conhecida como Alfavaca (na região Norte), alfavaca doce; manjeriço doce, remédio de vaqueiro; erva-real; manjeriço da folha grande, o

manjeriço é largamente utilizado na culinária brasileira, seu óleo essencial é valorizado no mercado internacional e amplamente usado nas indústrias de condimentos (PINTO; SANTIAGO, 2000).

Na medicina tradicional, as espécies de manjeriço têm sido utilizadas como estimulantes digestivos, antiespasmódico, gástrico, anti-septico dentre outras atribuições (MARTINS et al., 1994).

As espécies do gênero *Ocimum*, como *O. basilicum*, tem grande demanda no mercado, em razão do seu óleo essencial apresentar diversos constituintes de interesse industrial. As perspectivas comerciais de utilização dos óleos essenciais são excelentes, diante das restrições a aromatizantes artificiais (NOLASCO, 1996).

### **2.3.3 Tomilho (*Thymus vulgaris*)**

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.) é uma planta da família Lamiaceae que compreende 150 gêneros, com cerca de 2800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo. Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas como condimentos ou como flores ornamentais (PORTE; GODOY, 2001).

É uma planta arbustiva, caule tortuoso, lenhoso, ramos acinzentados, eretos e compactos, com folhas pequenas, sésseis, lanceoladas, esbranquiçadas na face inferior e com flores rosadas ou brancas (CORREA, 1994).

O óleo essencial de tomilho possui atividades antimicrobianas, carminativa e expectorante, atribuídas ao timol e ao carvacrol (Figura 4) que são componentes fenólicos majoritários encontrados no óleo essencial, sendo o timol o mais eficiente. As atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo

essencial de tomilho foram demonstradas por diversos investigadores como Daferera, Ziogas e Polissioi (2000) e Kalemba e Kunicka (2003).

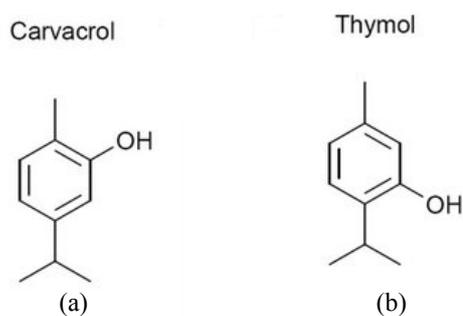


Figura 4 Estruturas químicas do (a) carvacrol e (b) timol  
Fonte: Simões (2007)

O tomilho tem sido usado em fitoterápicos, em cosméticos e em indústrias de alimento. Na medicina ocidental, a aplicação principal está no tratamento de problemas digestivos, respiratórios e na prevenção e no tratamento de infecções (SANTOS et al., 2007).

Segundo Santurio et al. (2007) o óleo essencial de tomilho apresentou moderada atividade sobre os isolados de *Salmonella enterica*, mas, pesquisas realizadas por Santos et al. (2007) mostraram através de ensaios microbiológicos que o óleo essencial de tomilho apresentava considerável atividade contra o *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gram positiva que comprovadamente possui maior susceptibilidade a óleos essenciais.

#### 2.4 Microrganismos envolvidos em toxinfecção alimentar

Atualmente tem-se observado aumento exponencial das reservas alimentares, das fontes de matérias-primas e da distribuição em escala mundial dos produtos acabados, assim as doenças transmitidas por alimentos,

notadamente as gastroenterites de origem bacterianas, na forma de surtos ou não, se constituíram no problema sanitário mais freqüente (SILVA JUNIOR, 2002).

Os microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos são normalmente divididos em dois grupos: infecciosos (*Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli*) e intoxicantes (*B. cereus*, *S. aureus*, *C. Botulinum*). O primeiro grupo microbiano compreende os microrganismos que se multiplicam no trato intestinal humano, enquanto o segundo é formado por aqueles microrganismos que produzem toxinas, tanto nos alimentos quanto durante sua passagem pelo trato intestinal. Essa divisão é bastante útil, pois auxilia no reconhecimento das rotas da enfermidade alimentar.

Doenças de origem alimentar não se limitam apenas ao trato gastrointestinal, mas também afetar outros órgãos podendo causar distúrbios no sistema nervoso, na corrente circulatória, no aparelho genital, no fígado, etc. Essas doenças podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, protozoários e vírus (FRANCO, 1996).

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, podendo levar a doenças, manifestadas por ação de microrganismos patogênicos ou por suas toxinas. Muitas intoxicações alimentares têm etiologia conhecida, sendo que a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* São agentes patogênicos mais comumente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar (STAMFORD et al., 2006).

A contaminação microbiana nos alimentos representa um importante problema de saúde pública e seu controle gera economia para a sociedade (CELIK TAS et al., 2005).

#### **2.4.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é causador de um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar em todo o mundo, sendo necessárias cerca de  $10^6$  células deste microrganismo por grama de alimento para que a toxina seja acumulada em níveis capazes de provocar toxinoses (RODRIGUES et al., 2004).

O nome *Staphylococcus* origina-se do grego *sthapylé* que significa cacho de uvas, isso se deve ao fato de que os cocos Gram-positivos são dispostos em cachos irregulares semelhantes a cachos de uva. O gênero *Staphylococcus* é constituído por cerca de 32 espécies sendo algumas patogênicas (MURRAY et al., 2004).

*Staphylococcus aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não formadoras de esporos, algumas cepas são produtoras de enterotoxinas termoestáveis (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000), sendo considerado atualmente o maior causador de toxinoses, pois algumas cepas são capazes de produzir enterotoxinas, nas diferentes etapas de processamento dos alimentos (SANTOS, 2004).

Estes microrganismos estão presentes na pele e nas membranas mucosas dos seres humanos, o que torna o processo de manipulação de alimentos um meio de transmissão (MURRAY et al., 2004). Em geral, alimentos que requerem muita manipulação durante a preparação e que, após, são mantidos em temperaturas elevadas, apresentam maior risco de causar esta intoxicação, pois uma vez produzida a toxina, esta resistirá ao tratamento térmico podendo causar vômito e diarreia (RODRIGUES et al., 2004).

Os principais alimentos capazes de suportar o desenvolvimento natural de *S. aureus* são produtos lácteos, como queijos, leite cru ou pasteurizado, manteiga e sorvetes, produtos de confeitaria, como bolos, tortas e doces cremosos, carnes frescas e curadas, ovos e massas (SANTOS, 2004).

#### **2.4.2 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* é um dos agentes etiológicos freqüentemente isolados em casos de diarreia no homem. São bactérias patogênicas transientes que podem tomar vantagem ou provocar distúrbios sobre a microbiota normal, aumentando muito em número e causar sinais de doença ou infecção. São veiculadas aos alimentos normalmente pela manipulação incorreta e/ou práticas precárias de higiene. A *E. coli* além de causar toxinfecção alimentar pode ainda diminuir a vida útil de prateleira dos alimentos, gerando perdas econômicas (MOREIRA et al., 2005).

O gênero *Escherichia* consiste em cinco espécies, das quais a *Escherichia coli* é o mais comum e clinicamente importante. Este microrganismo está associado a uma série de doenças tais como meningite e gastroenterite (MURRAY et al., 2004). A *E. coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbica facultativa e compõe o trato intestinal do homem, está relacionada a contaminação fecal quando encontrada em alimentos, algumas cepas podem produzir enterotoxinas originando graves doenças alimentares (TORTORA, 2002).

Os diversos tipos de *Escherichia coli* relatados na literatura são caracterizados por combinações de antígenos dando origem a sorotipos diferentes. Essa classificação sorológica é útil em epidemiologia pois são relacionadas com a virulência (TORTORA, 2002).

É necessário destacar dentre os grupos bacterioclínicos para *E. coli*, o grupo enteropatogênico, enterotoxigênico. Nas enteropatogênicas os plasmídios medeiam a histopatologia com destruição da estrutura normal das microvilosidades, resultando na má absorção de nutrientes e diarreia. Já as cepas enterotoxigênicas produzem enterotoxinas termolábeis e/ou termoinstáveis mediadas por plasmídios que estimulam a hipersecreção de líquidos e eletrólitos (MURRAY et al., 2004).

*Escherichia coli* geralmente permanece confinada no intestino sem causar nenhum dano, entretanto em organismos debilitados ou imunodeprimidos, quando a barreira gastrointestinal é violada, até mesmo as linhagens não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (CORREA, 2000).

### 2.4.3 *Salmonella* sp

As salmonelas estão amplamente difundidas na natureza e são capazes de infectar o homem. Os casos de toxinfecções alimentares causados por *Salmonella* aumentaram a partir da década de 80. Este aumento pode ser atribuído ao consumo de ovos e subprodutos contaminados por *Salmonella* (NADVORNY; FIGUEREDO; SCHMIDT, 2004).

O gênero *Salmonella* é um gênero que apresenta problemas quanto a sua classificação taxonômica devido a descrição de mais de 2000 (dois mil) sorogrupos distintos, ele é dividido em duas espécies a *Salmonella enterica* e *Shigella bongori* (MURRAY et al., 2004).

*Salmonella* sp quando ingerida passa pelo estômago e invade as células M (micropregas) localizadas na porção final do intestino delgado, lá ela se reproduzem. As membranas pregueadas envolvem e englobam a bactéria, ocorrendo uma replicação intracelular no fagossomo com subsequente morte da célula hospedeira e disseminação para as células epiteliais adjacentes e para o tecido linfóide. A resposta inflamatória confina a infecção do trato gastrointestinal, promovendo a liberação de prostaglandinas e a secreção ativa de líquidos (MURRAY et al., 2004).

*Salmonella* sp pode colonizar praticamente todos os animais, incluindo aves domésticas, animais de granja e seres humanos. A maioria das infecções causadas por *Salmonella* sp resulta da ingestão de alimentos contaminados, as

infecções acometem em geral crianças abaixo de 5 anos e idosos acima de 60 anos (MURRAY et al., 2004).

Segundo Nadvorny, Figueiredo e Schmidt (2004), desde 1993 a *Salmonella* sp. tem sido o patógeno envolvido em DTA (Doença Transmitidas por Alimentos) de maior ocorrência em diversos estados brasileiros, assim como em países da Europa e das Américas. Neste mesmo estudo os autores inferiram que 74,7 % dos surtos de DTA confirmados no Rio Grande do Sul correspondiam a salmoneloses, associadas ao consumo de alimentos preparados com ovos crus.

## **2.5 Ação antimicrobiana de óleos essenciais**

Os óleos essenciais, caracterizados como metabólitos secundários de plantas e de baixa toxicidade a mamíferos, são amplamente testados no controle de patógenos.

Foi relatada a atividade antimicrobiana de compostos ativos purificados de óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, tradicionalmente usados na medicina popular brasileira para tratar diferentes doenças como infecções no trato respiratório, diarreias, doenças de pele, pneumonias e também febre, tosse e conjuntivite. O composto que apresentou atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas no óleo essencial foi identificado como eugenol (NAKAMURA et al., 1999).

Outras pesquisas foram relatadas sobre atividade antimicrobiana, como o óleo de andiroba, com ação antiinflamatória óleo de copaíba, com vários constituintes químicos voláteis e resinosos com ação germicida e antiinflamatória; óleo de alecrim, com ação antimicrobiana, antifúngica e antisséptica; óleo de melaleuca, com ação bacteriostática frente à *E. coli*, *S.*

*aureus*, e *Candida albicans* e óleo de alho, com ação antifúngica e antihelmíntica (MICHELIN et al., 2005).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, tem mostrado ser ativo contra leveduras do gênero *Candida* (LIMA; FARIAS, 1999). Tal atividade segundo o autor deve-se ao citral (mistura dos isômeros acíclicos monoterpene aldeído: geranial - *trans*-citral, citral A e neral - *cis*-citral, citral B), componente majoritário do óleo. É encontrado em folhas e frutas de várias espécies de plantas, como limão, laranja e capim-limão. Apresenta sabor e odor característico de limão, por isso é usado como condimento em alimentos como, em goma de mascar, sorvetes e bebidas além de ser empregado como fragrância em cosméticos, sabonetes, detergentes, cremes, loções etc. O citral vem sendo utilizado em pesquisas, no intuito de verificar a ação antimicrobiana em fungos filamentosos (FERREIRA et al., 2002).

Entre outras espécies reconhecidas como produtoras de óleo essencial anti-séptico se destacam o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) (NTELZURUBANZA; SCHEFFER; SWENDSEN, 1987), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.) e sálvia (*Salvia officinalis* L.).

Estudos vêm sendo desenvolvidos na área de produtos naturais, bem como seus compostos e derivados, que possuem suas atividades testadas sobre diversos microrganismos conhecidos por serem patogênicos a humanos.

É interessante, portanto, que estudos na área de produtos naturais sejam aprofundados no intuito de se conhecerem melhor suas atividades biológicas e, possivelmente, serem utilizados no controle de microrganismos, uma vez que, além da sua atividade individual, podem ser associados a outros produtos.

O consumidor tem se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade do produto que consome. É crescente a sua preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem.

## 2.6 Interações entre óleos essenciais

As plantas são organismos vivos que produzem inúmeros metabolitos secundários, mas apenas os compostos que estão em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. Analisar os compostos ativos é uma tarefa mais complexa e longa, pois geralmente os compostos minoritários estão entre os que também podem apresentar efeitos biológicos. Assim, é indispensável analisar a potencia das frações e das substâncias puras em relação a sua concentração, pois, essas, além de possivelmente apresentarem efeitos isoladamente podem contribuir ou inibir a atividade de outras plantas. A partir desta avaliação pode-se concluir qual ou quais componentes químicos são responsáveis pela atividade biológica (SILVA, 2010).

As pesquisas em sinergismo tem-se tornado uma atividade fundamental nos últimos anos . Seu princípio consiste na busca pela melhor utilização de extratos, plantas ou seus componentes, de forma a alcançar a superioridade terapêutica. O sinergismo consiste na variação do efeito biológico pela mistura de componentes bioativos, sejam eles sintéticos ou naturais (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Segundo Nascimento et al. (2000), o uso associado de plantas medicinais e/ou seus subprodutos podem atuar inibindo ou intensificando o efeito terapêutico de princípios ativos convencionais, bem como não interferir na resposta esperada, sendo assim pode-se concluir que o uso de diversas plantas ou de seus subprodutos (óleos essenciais) também segue o mesmo raciocínio.

Nos dias atuais são empregadas inúmeras formas de sinergismo entre óleos essenciais e outros componentes bioativos; observa-se a aplicação da combinação de moléculas bioativas em herbicidas, medicamentos e frequentemente na indústria de cosméticos (FURTADO et al., 2005). A

utilização de combinação entre moléculas de atividade comprovada não é uma exclusividade dos produtos naturais, haja vista o emprego de combinações multi-drogas para o tratamento de AIDS ou hipertensão. O que se sabe é que o efeito terapêutico de um produto bioativo pode ser decisivo no tratamento em questão (WILLIAMSON, 2001). Contudo estes mecanismos nos quais os produtos bioativos aparecem inibindo ou acentuando os efeitos uns dos outros precisam ser melhor descritos.

Sendo assim a utilização combinatória de óleos essenciais na indústria de alimentos pode ser uma grande arma no combate de patógenos, aumentando assim a qualidade e segurança alimentar sem intervir no aspecto sensorial.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção dos óleos essenciais**

##### **3.1.1 Coleta do material vegetal**

Os materiais vegetais frescos (manjerição e pimenta de macaco) foram coletados no Horto de Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Lavras, na cidade de Lavras localizada no sul do estado de Minas Gerais (Brasil), 21°14'S, longitude 45°00'W Gr. E 918 m de altitude no período da manhã nos meses de junho e julho de 2008. O tomilho foi adquirido, na forma seca, no mercado central da cidade de Belo Horizonte (MG) na mesma época.

##### **3.1.2 Extração dos óleos essenciais**

Para extração dos óleos essenciais, empregou-se a metodologia de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado. As folhas frescas e secas de cada espécie vegetal estudada foram picadas e colocadas em um balão de 1 litro de capacidade, recobertas com água, sendo o processo de extração realizado em um período de 2 horas e em triplicata descrito por Guimarães et al. (2008).

O óleo foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando-se uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby® I Modelo 206 BL) a 965,36 x G por 5 min. O óleo foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenado em freezer.

##### **3.1.3 Determinação da umidade**

Paralelamente às extrações, realizou-se o teste de umidade, de acordo com Pimentel et al. (2008). Utilizaram-se 5g de material vegetal imersos em 80 mL de ciclohexano em balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador com coletor graduado. O balão foi aquecido por meio de manta aquecedora. Após 2,5 horas, o volume de água presente no material foi quantificado. O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em massa de óleo por massa de vegetal com base livre de umidade (%m/m BLU).

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

As análises de identificação e quantificação dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS) – Aracaju – SE, por Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG-EM.

O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu G-17A equipado com detector seletivo de massa modelo QP5050A. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25 DI com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280 °C; programação da coluna com temperatura inicial de 50 °C por 2 min, com um aumento de 4°C/min., até 200 °C, depois 10 °C/min até 300 °C, finalizando com uma temperatura de 300 °C por 10 min; gás carreador hélio (1mL min<sup>-1</sup>); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa de split 1:83 e volume injetado de 0,5 µL (1% de solução em diclorometano).

Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto de 70 eV; velocidade de decomposição 1000; intervalo de decomposição de 0,50; e fragmentos de 40 Da e 550 Da decompostos.

### 3.3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais

#### 3.3.1 Padronização estocagem e preparação do inóculo

As cepas utilizadas neste estudo foram de *S. aureus* (ATCC 13565), *Salmonella enteritidis*. (S64) e *E. coli* (ATCC 25922). Para a padronização do número de células as cepas foram inicialmente inoculadas individualmente em frascos erlenmeyers contendo 100 mL de caldo Triptona de soja (TSB) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia), os quais foram incubados a 37°C. Em seguida, a partir do TSB, a curva de crescimento foi determinada pela realização periódica de leituras de absorbância da cultura a 600nm e de diluições seriadas em solução salina (NaCl 0.9% p/v) com posterior plaqueamento em superfície para determinação do Log UFC.mL<sup>-1</sup>, utilizando-se como meio de cultura Agar triptona de soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia).

Durante a realização de todo o experimento, as cepas foram estocadas sob refrigeração em meio de cultura de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; pH 7,2± 0,2). Para reativação e utilização da cepa, uma alíquota do meio de cultura de congelamento dói transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37°C, por 24 horas, neste meio de cultura. Em seguida, a cultura foi estriada em TSA vertido em placas de Petri e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, uma alçada foi retirada e transferida para um frasco erlenmeyer contendo 150 mL de TSB, o qual foi incubado a 37° C, até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi realizada de acordo com a metodologia de difusão em cavidade em ágar sugerida por Mendonça (2004), adaptada para este estudo. Como meio de cultura, utilizou-se TSA. Para o preparo das cavidades de deposição dos óleos essenciais, uma camada inicial do meio de cultura foi depositada em placa de petri, sobre as quais, após a solidificação, foram dispostas pérolas de vidro padronizadas de 3mm de diâmetro.

Uma sobrecamada do meio de cultura contendo o inóculo na concentração de, aproximadamente,  $10^8$  UFCmL<sup>-1</sup> foi depositada sobre as pérolas de vidro na superfície da camada inicial. Após a solidificação da sobrecamada, as pérolas de vidro foram removidas com auxílio de pinça estéril, dando origem às cavidades.

Em cada placa de petri foram realizadas 10 cavidades. Em seguida, 10µL das diferentes concentrações dos óleos (0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,00; 50,00) expressas em %(v/v) dos óleos essenciais de Tomilho, manjeriço e pimenta de macaco, e das combinações das concentrações dos óleos foram transferidas para as cavidades. A concentração de 0% constituída de apenas DMSO foi utilizada como controle, em outra cavidade foi depositado 10µL de Cloranfenicol como controle positivo.

As placas foram incubadas, a 37°C, por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados retirando-se 3mm referentes ao diâmetro da cavidade. A presença de efeito bacteriostático foi caracterizada pelo comprimento do crescimento bacteriano pela formação de halo de inibição. A menor concentração que apresentou efeito bacteriostático foi definida como concentração mínima inibitória (CMI).

### **3.3.3 Ensaio de interação entre óleos essenciais**

A partir da análise do comportamento dos óleos de tomilho, manjerição e pimenta de macaco, frente aos diversos microrganismos de estudo e das concentrações mínimas inibitórias, foi sugerido a combinação de 4 concentrações destes em todas as suas possibilidades, sendo a primeira igual a 0%, representando o controle para os óleos e três outras concentrações, baixa (mínima inibitória), média e alta (igual ou inferior a 25%) ocasionando 64 tratamentos. As concentrações adotadas para o óleo de manjerição foram 0; 3,13; 12,5 e 25%, para o óleo essencial de pimenta de macaco 0; 6,25; 12,5; 25% e para o óleo essencial de tomilho 0; 0,4; 3,13; 12,5% .

### **3.4 Análise Estatística**

Para avaliação do sinergismo foi aplicada a análise estatística de variância de acordo com o modelo adequado para os experimentos laboratoriais, conforme Pimentel-Gomes (2000), e com aplicação de metodologia de superfície de resposta. Os dados relativos à atividade antimicrobiana foram submetidos à análise de variância e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância foi aplicado para identificar diferenças entre as médias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Rendimento de óleos essenciais

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para o rendimento dos óleos essenciais de tomilho, manjeriçã e pimenta de macaco.

Tabela 1 Rendimento dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação expresso em % m/m de material vegetal fresco

Material Vegetal	Rendimento (% m/m)
Manjeriçã	1,43 a
Tomilho	0,74 b
Pimenta de macaco	0,43 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Pode-se perceber que dentre os óleos estudados, o de manjeriçã apresenta rendimento significativamente superior quando comparado aos óleos de tomilho e pimenta de macaco. Nota-se ainda que a pimenta de macaco apresentou o menor rendimento dentre as plantas utilizadas no estudo. Estes dados corroboram com aqueles relatados por Gaio (2008), aonde estes encontraram um valor de 1,23% m/m para o óleo essencial de manjeriçã. Este resultado encontra-se próximo ao deste estudo (1,43% m/m).

Outros trabalhos, como o de Pokrywiecki (2006), relatam a variação dos teores de rendimento obtidos para o manjeriçã quando coletados em épocas diferentes do ano. Ainda neste estudo, o autor relata variação no rendimento de óleo essencial de manjeriçã entre as estações inverno e primavera por dois anos consecutivos, com rendimento oscilando entre 0,1 a 2,1 % m/m.

Variações no rendimento dos óleos, assim como oscilações em sua composição podem ocorrer por diversas condições, tais como: sazonalidade, horário de colheita do vegetal e condições bioquímicas e fisiológicas (intraplanta) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Além desses fatores, é necessário destacar também o ritmo ciclo circadiano, disponibilidade de água e nutrientes para o desenvolvimento do vegetal.

Avaliando o rendimento do óleo essencial de tomilho é possível verificar que os valores médios encontrados de 0,74 % m/m, condizem com os dados da literatura mais recente. Estudo realizado por Torras et al. (2007) apresentou valores de rendimento de óleo essencial de tomilho entre 0,24 e 0,98% m/m, provenientes de oito amostras coletadas nos meses de fevereiro a junho de 2004. Neste mesmo estudo, o rendimento médio de óleo essencial de tomilho observado no mês de junho (0,81% m/m), aproxima-se do resultado deste estudo (0,74% m/m). Vale destacar que o material vegetal da presente pesquisa foi coletado em período similar, meados do mês de junho.

Os resultados do rendimento do óleo essencial para a pimenta de macaco (*Piper aduncum*) mostram-se inferiores aos demais óleos essenciais obtidos neste trabalho. Estudos como o de Vila et al. (2005) revelam que o rendimento de óleo essencial da espécie *Piper aduncum* normalmente é baixo, relatando médias máximas de 0,6% m/m de óleo essencial, valor próximo àquele observado no presente trabalho (0,43% m/m).

## **4.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais**

### **4.2.1 Principais componentes químicos e mecanismo de ação antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais varia de acordo com a composição química dos mesmos e dos microrganismos em questão. Alguns mecanismos descrevem as diferentes formas de ação das substâncias de origem vegetal sobre bactérias, fungos e leveduras, sendo mais difundida a interação com a membrana celular aumentando a permeabilidade que favorece a lise da célula, a complexação com íons diminuindo a disponibilidade para os microrganismos, a interação com substrato impedindo a atividade enzimática e a desestabilização da força próton motriz (FPM), o fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo citoplasmático (BURT, 2004; LOGUERCIO et al., 2005; TORRES et al., 2000; VARGAS et al., 2004).

Os ensaios de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) realizados para os óleos, permitiu a descoberta dos principais componentes químicos encontrados nos metabólitos secundários das plantas em estudo. Essa confirmação se fez necessário uma vez que a região de cultivo, condições de clima e colheita assim como outros fatores supra-citados interferem diretamente nas características da planta.

Estudos de Dorman e Deans (2000) relatam que o carvacrol e timol são agentes antimicrobianos que atuam na parede celular das células bacterianas, causando a ruptura e extravasamento do conteúdo intracelular. Observa-se que estes são os componentes químicos majoritários presentes no óleo essencial de tomilho conforme os dados obtidos por (GC-MS). Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Pelos dados descritos na Tabela 2 observa-se que outros componentes como o-cimeno (10,63%) ,  $\gamma$ -terpineno (3,05%) e linalol (4,36%) também aparecem como componentes em proporções consideráveis. Segundo Silva et al. (2010) óleos essenciais que apresentam p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno além de carvacrol e timol podem ter seu efeito antimicrobiano potencializado. Neste estudo Silva

et al. (2010) mensuram que microrganismo como *Salmonella enteritidis* sofrem este tipo de ação antimicrobiana potencializada.

Tabela 2 Componentes químicos caracterizados e quantificados no óleo essencial de tomilho por GC-MS

TR (min)	Composto	% CG-EM	IR exp.
6.810	$\alpha$ -tujeno	0.33	932
7.324	Canfeno	0.29	948
8.307	1-octen-3-ol	0.94	979
8.618	Mirceno	0.44	989
9.564	$\alpha$ -terpineno	0.51	1017
<b>9.850</b>	<b>o-cimeno</b>	<b>10.63</b>	<b>1024</b>
10.110	1,8-cineol	0.54	1032
<b>11.048</b>	<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	<b>3.05</b>	<b>1058</b>
<b>12.600</b>	<b>Linalol</b>	<b>4.36</b>	<b>1100</b>
14.331	Cânfora	0.59	1147
17.695	Éter metil carvacrol	0.61	1238
<b>19.684</b>	<b>Timol</b>	<b>63.46</b>	<b>12.93</b>
<b>19.892</b>	<b>Carvacrol</b>	<b>3.62</b>	<b>1299</b>
24.037	(E)-cariofileno	1.31	1419

tR (min) = tempo de retenção em minutos; IR exp. = Índice de retenção experimental

O linalol, também presente no óleo essencial de tomilho, tem reconhecida atividade antimicrobiana comprovada por Duarte (2006), que verificou que essa substância é a responsável pela atividade antimicrobiana de diversas espécies de bactérias e leveduras, dentre elas *E. coli* e *S. aureus*.

Os componentes químicos identificados e quantificados no óleo essencial de manjeriço estão descritos na Tabela 3. Nota-se que os componentes majoritários são linalol, 1,8-cineol e eugenol (42,05%, 15%, 6,44%) respectivamente. O eugenol ou 4-hidroxi-3-metoxialilbenzeno, é largamente encontrado no reino vegetal, principalmente no óleo de cravo da Índia, canela, noz-moscada e plantas do gênero *Ocimum*.

Tabela 3 Componentes químicos caracterizados e quantificados no óleo essencial de manjeriço por GC-MS

TR (min)	Composto	% CG-EM	IR exp.
6.809	$\alpha$ -pineno	0.47	932
7.323	Canfeno	0.39	948
8.060	Sabineno	0.39	971
8.218	$\beta$ -pineno	0.97	976
8.618	Mirceno	0.86	989
9.998	Limoneno	0.99	1029
<b>10.112</b>	<b>1,8-cineol</b>	<b>15</b>	<b>1032</b>
12.162	Fenchona	0.76	1088
<b>12.632</b>	<b>Linalol</b>	<b>42.05</b>	<b>1101</b>
14.342	Cânfora	0.59	1147
15.198	$\delta$ -terpineol	0.82	1170
16.123	$\alpha$ -terpineol	4.81	1195
<b>21.715</b>	<b>Eugenol</b>	<b>6.44</b>	<b>1351</b>
24.033	(E)-cariofileno	0.44	1419
26.068	$\gamma$ -muroleno	1.48	1481

tR (min) = tempo de retenção em minutos; IR exp. = Índice de retenção experimental

Em contraste com outros alilbenzenos, o eugenol é reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) como seguro quando usado em alimentos em concentrações de até  $1.500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (PEREIRA; MAIA, 2007).

Estudos realizados por Pereira e Maia (2007) revelaram que o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* cujos compostos majoritários caracterizados foram o 1,8 cineol e eugenol apresentaram importante atividade antimicrobiana contra microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*

O óleo essencial de pimenta de macaco apresentou como componentes principais substâncias químicas linalol, (E) nerolidol e óxido de cariofileno estes e os demais componentes químicos estão relacionados na tabela 4.

Tabela 4 Componentes químicos caracterizados e quantificados no óleo essencial de pimenta de macaco por GC-MS

TR (min)	Composto	% CG-EM	IR exp.
10.632	$\beta$ -ocimeno	0.53	1046
<b>12.624</b>	<b>Linalol</b>	<b>46.94</b>	<b>1101</b>
20.035	2-undecanol	1.00	1303
24.032	$\beta$ -funebreno	1.30	1419
25.222	$\alpha$ -humuleno	1.26	1455
26.544	2-tridecanona	1.76	1495
27.175	$\gamma$ -cadineno	0.77	1515
<b>28.629</b>	<b>(E)-nerolidol</b>	<b>29.45</b>	<b>1562</b>
<b>29.270</b>	<b>óxido de cariofileno</b>	<b>3.83</b>	<b>1582</b>

tR (min) = tempo de retenção em minutos; IR exp. = Índice de retenção experimental

A atividade antimicrobiana exercida pelo componente majoritário desta espécie (linalol) já é descrita na literatura. O nerolidol também presente no seu óleo essencial é um sesquiterpeno comumente encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas. É aprovado pela agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) como um agente flavorizante utilizado em alimentos e mostra-se como o um agente antimicrobiano com espectro restrito. Estudos como o de Gelinski et al. (2007) relataram que o nerolidol não inibiu o crescimento de algumas bactérias Gram negativas como *Salmonella* sp., *E. coli*, e *Proteus* sp. Porém bactérias Gram positivas como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* foram sensíveis, apesar da pequena inibição apresentada.

A atividade antimicrobiana exercida pelo componente majoritário desta espécie (linalol) já é descrita na literatura. O nerolidol também presente no seu óleo essencial é um sesquiterpeno comumente encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas. É aprovado pela agência reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) como um agente flavorizante utilizado em alimentos e mostra-se como o um agente antimicrobiano com espectro restrito. Estudos

como o de Gelinski et al. (2007) relataram que o nerolidol não inibiu o crescimento de algumas bactérias Gram negativas como *Salmonella* sp., *E. coli*, e *Proteus* sp. Porém bactérias Gram positivas como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* foram sensíveis, apesar da pequena inibição apresentada.

Além da composição química, outro fator preponderante que tange a atividade antimicrobiana de um determinado óleo essencial é a concentração de células do microrganismo presentes no meio em ensaio. A maioria dos artigos publicados nesta área diverge em valores de concentração mínima inibitória, pois há grande variação UFCs do microrganismo em questão presentes nos meios utilizados nos ensaios, o que dificulta a comparação de resultados.

#### **4.2.2 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) para os microrganismos em estudo**

Na Tabela 5 é possível verificar que a partir de um gradiente de concentrações do óleo essencial de manjeriço realizado por diluições seriadas, o efeito inibitório sobre *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus*, iniciou-se em concentrações iguais ou superiores a 3,13%. Portanto, a menor concentração aplicada nos ensaios de sinergismo para o óleo essencial de manjeriço foi de 3,13%.

De acordo com os dados desta tabela, verifica-se que à medida que se aumenta a concentração do óleo essencial de manjeriço ocorre o aumento dos halos de inibição. Os dados não apresentarem diferença significativa entre algumas concentrações, de uma forma geral é possível verificar que há diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5% para o comportamento do óleo frente às bactérias aplicadas a este trabalho. Percebe-se ainda que para *S. aureus* são encontrados valores mais altos de halos de inibição quando comparamos com as demais bactérias nas mesmas concentrações.

Tabela 5 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum*) - halos de inibição (mm) para microrganismos em estudo

Concentração de óleo (%)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
50	10,40 b	12,70 a	6,67 b
25	10,50 b	13,57 a	5,67 bc
12,5	8,83 b	12,17 a	5,00 c
6,25	5,67 c	5,17 b	5,00 c
3,13	4,00 c	4,00 b	4,50 c
1,56	0,00 d	0,00 c	0,00 d
0,78	0,00 d	0,00 c	0,00 d
0,39	0,00 d	0,00 c	0,00 d
CP	18,33 a	13,57 a	15,00 a
CN	0,00 d	0,00 c	0,00 d

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CP = Controle Positivo (cloranfenicol) CN = Controle Negativo (DMSO)

#### 4.2.3 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) para microrganismos em estudo

Os dados relativos aos testes realizados com os mesmos microrganismos para o óleo essencial de tomilho estão expressos na Tabela 6.

A análise dos resultados indica que este óleo apresenta maior atividade antimicrobiana em relação ao manjeriço, pois exerce efeito inibitório para todas as bactérias avaliadas em concentrações mais baixas. Nota-se que em concentrações mais altas, o tomilho apresenta efeito igual ou superior ao controle positivo empregado (Cloranfenicol), confirmando o elevado potencial antimicrobiano apresentado pelo óleo essencial de tomilho que é atribuído as substâncias timol, carvacrol, o-cimeno e  $\gamma$ -terpineno.

Para a escolha das concentrações a serem aplicadas nos ensaios de sinergismo, optou-se por menores concentrações do óleo essencial de tomilho,

uma vez que mesmo em baixas concentrações foi possível perceber ampla atividade antimicrobiana.

Tabela 6 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Tomilho (*Thymus vulgaris*) - halos de inibição (mm) para microrganismos em estudo

Concentração de óleo (%)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
50	14,33 ab	19,67 a	19,67 a
25	16,00 a	18,5 a	14,33 abc
12,5	17,67 a	10,00 bc	15,67 ab
6,25	13,00 ab	8,67 cde	10,83 bcd
3,13	9,67 bc	9,17 bcd	8,50 cd
1,56	7,33 c	7,5 cde	7,17 d
0,78	6,00 c	6,17 de	6,00 de
0,39	5,00 cd	5,33 e	5,00 de
CP	17,67 a	12,67 b	15,00 ab
CN	0,00 d	0,00 f	0,00 e

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CP = Controle Positivo (cloranfenicol) CN = Controle Negativo (DMSO)

Outra razão pela qual se empregou concentrações inferiores de óleo essencial de tomilho refere-se à característica organoléptica deste óleo essencial, que é extremamente característica quanto ao sabor e aroma, como o intuito da presente pesquisa é encontrar formas viáveis de emprego das misturas dos óleos essenciais sinergicamente para a indústria de alimentos entende-se que estes não podem interferir demasiadamente nas características organolépticas dos mesmos.

#### 4.2.4 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta de macaco (*Piper aduncum*) para microrganismos em estudo

O óleo essencial da pimenta de macaco para os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteritidis*. não apresentou grande efeito inibitório e portanto com

pouca expressividade dentre os óleos estudados. Verifica-se pelos dados da Tabela 7 que a partir da concentração de 6,25% há atividade antimicrobiana para *S. enteritidis*. e *S. aureus*, porém para *E. coli* nota-se atividade antimicrobiana somente para concentrações de 25% do óleo. Porém, o intuito de se manter esse óleo no estudo das interações foi a visualização de potencialização ou neutralização dos efeitos dos outros óleos.

Tabela 7 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Pimenta de macaco (*Piper aduncum*) - halos de inibição (mm) para microrganismos em estudo

Concentração de óleo (%)	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>
50	8,33 b	11,5 b	5,67 b
25	7,00 c	10,00 c	4,83 b
12,5	6,00 d	7,67 d	0,00 c
6,25	5,00 e	6,17 e	0,00 c
3,13	0,00 f	0,00 f	0,00 c
1,56	0,00 f	0,00 f	0,00 c
0,78	0,00 f	0,00 f	0,00 c
0,39	0,00 f	0,00 f	0,00 c
CP	14,33 a	16,50 a	13,67 a
CN	0,00 f	0,00 f	0,00 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade. CP = Controle Positivo CN = Controle Negativo

### 4.3 Atividade antimicrobiana entre as misturas dos óleos essenciais

#### 4.3.1 Atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco sobre *E. coli*

A Tabela 8 apresenta os valores de halos de inibição desenvolvidos durante os ensaios de sinergismo para cada uma das 64 (sessenta e quatro) combinações dos óleos essenciais para a bactéria *E. coli*.

Tabela 8 Porcentagem de óleos essenciais para os tratamentos e média de halos da atividade antimicrobiana frente *E. coli*

Trat.	% Óleos Essenciais			Média de Halos em mm	Trat.	% Óleos Essenciais			Média de Halos em mm
	Manj.	Tom.	P. Mac.			Manj.	Tom.	P. Mac.	
1	0	0	0	0,00	33	12,5	0	0	3,00
2	0	0	6,25	0,00	34	12,5	0	6,25	3,33
3	0	0	12,5	0,00	35	12,5	0	12,5	3,50
4	0	0	25	1,67	36	12,5	0	25	3,00
5	0	0,4	0	2,33	37	12,5	0,4	0	3,17
6	0	0,4	6,25	0,00	38	12,5	0,4	6,25	3,67
7	0	0,4	12,5	0,67	39	12,5	0,4	12,5	2,83
8	0	0,4	25	0,67	40	12,5	0,4	25	1,50
9	0	3,13	0	4,67	41	12,5	3,13	0	4,17
10	0	3,13	6,25	3,33	42	12,5	3,13	6,25	3,50
11	0	3,13	12,5	2,83	43	12,5	3,13	12,5	2,17
12	0	3,13	25	2,00	44	12,5	3,13	25	2,50
13	0	12,5	0	11,00	45	12,5	12,5	0	5,00
14	0	12,5	6,25	10,17	46	12,5	12,5	6,25	4,00
15	0	12,5	12,5	10,67	47	12,5	12,5	12,5	3,67
16	0	12,5	25	5,67	48	12,5	12,5	25	2,67
17	3,13	0	0	0,00	49	25	0	0	2,67
18	3,13	0	6,25	0,00	50	25	0	6,25	3,00
19	3,13	0	12,5	0,00	51	25	0	12,5	2,50
20	3,13	0	25	0,00	52	25	0	25	2,17
21	3,13	0,4	0	2,67	53	25	0,4	0	3,00
22	3,13	0,4	6,25	1,67	54	25	0,4	6,25	3,50
23	3,13	0,4	12,5	1,00	55	25	0,4	12,5	5,17
24	3,13	0,4	25	2,00	56	25	0,4	25	2,17
25	3,13	3,13	0	5,17	57	25	3,13	0	3,17
26	3,13	3,13	6,25	3,33	58	25	3,13	6,25	3,00
27	3,13	3,13	12,5	3,83	59	25	3,13	12,5	3,17
28	3,13	3,13	25	3,17	60	25	3,13	25	3,50
29	3,13	12,5	0	7,00	61	25	12,5	0	3,83
30	3,13	12,5	6,25	6,67	62	25	12,5	6,25	3,17
31	3,13	12,5	12,5	4,00	63	25	12,5	12,5	2,83
32	3,13	12,5	25	4,83	64	25	12,5	25	2,17

Trat. = tratamento; Manj. = manjeriço; Tom. = tomilho; P. Mac. = pimenta de macaco

Estão expressos nos gráficos de superfície de resposta (Figura 5) os valores apresentados na Tabela 5. Essa proposta amplifica a visualização dos resultados.

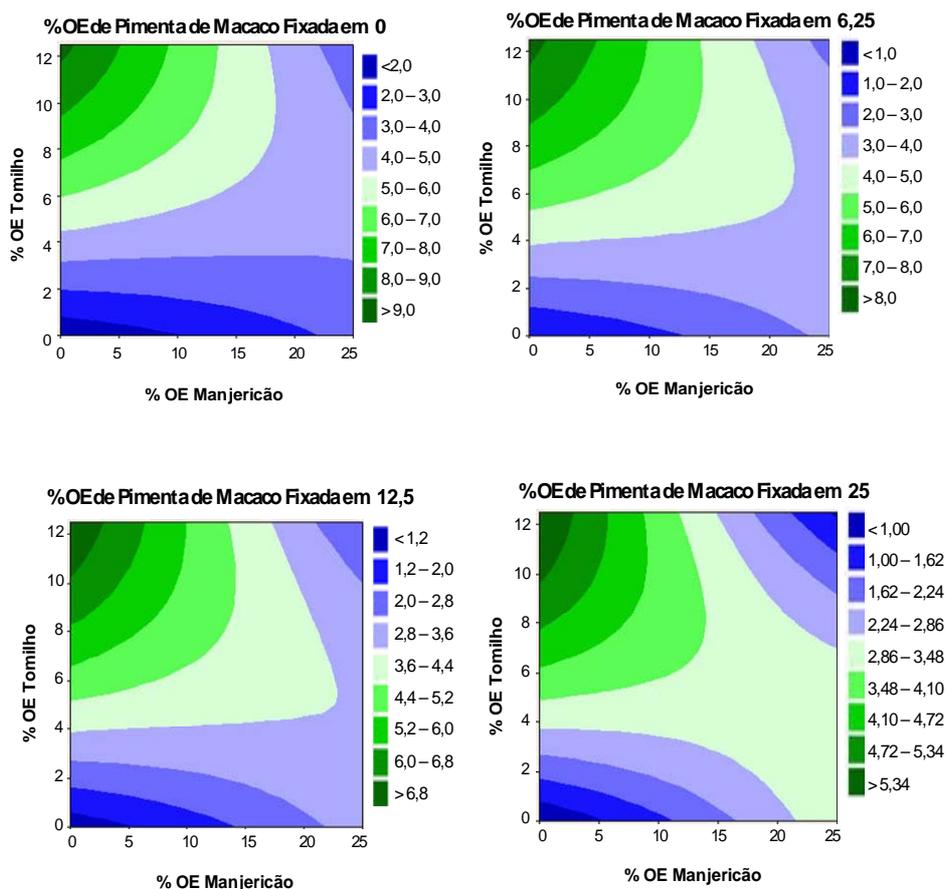


Figura 5 Superfície de resposta para halos de inibição expressos em mm das combinações de óleos essenciais contra *E. Coli*

Nos gráficos acima são observados halos de inibição para a bactéria *E. coli* quando submetidas a análise antimicrobiana sinérgica entre os óleos de tomilho, pimenta de macaco e manjeriçao, neles a concentração de óleo

essencial de pimenta de macaco está fixada e varia-se as concentrações de manjeriço e tomilho. Quando a concentração de manjeriço é nula e aumenta-se a concentração de tomilho ocorre aumento significativo dos halos de inibição, atingindo-se valores máximos (zonas verdes) para maiores concentrações do óleo essencial de tomilho.

Em estudos realizados por Oussalah (2007) é possível perceber que o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) apresenta grande atividade antimicrobiana isoladamente quando submetido a testes contra enterobactérias, destacando-se a *E. coli*. O estudo revela que os valores de concentração mínima inibitória (CMI) encontrada pelo autor, coincide com os valores de CMI do presente trabalho.

Nota-se ainda que se a concentração de tomilho é nula e aumenta-se a concentração de óleo essencial de manjeriço, à medida que se varia as concentrações de manjeriço há também aumento dos halos de inibição. Esta observação mostra que isoladamente esses óleos apresentam atividade antimicrobiana significativa.

Estudos de Trajano et al. (2009), com vários óleos essenciais de especiarias testadas em microrganismos, mostram que, o óleo essencial de manjeriço mostrou-se inibidor do crescimento de bactérias como *E.coli* e *P.aeruginosa*, sendo que os valores de halos de inibição obtidos pelos autores aproximam-se aos encontrados neste estudo para a *E. coli*.

Gaio (2008), descrevendo sobre a utilização de óleo essencial contra patógenos de origem alimentar, verificou que o óleo essencial de manjeriço apresentou efeitos inibitórios significativos contra *E. coli*, evidenciando o real potencial antimicrobiano deste óleo.

Isoladamente o óleo essencial de pimenta de macaco não apresentou expressiva atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli*, uma vez que nos gráficos acima nota-se que ao manter os valores de concentração de manjeriço

e tomilho fixos em 0% a oscilação máxima de halos de inibição permeiam entre 1 e 2 mm. A partir dos ensaios prévios sobre as concentrações mínimas inibitórias, tornou-se possível prever tal resultado.

Observando o comportamento antimicrobiano das soluções de óleos essenciais onde se variavam as concentrações de manjeriço e tomilho, percebe-se que o aumento da concentração de manjeriço promove diminuição da atividade antimicrobiana do tomilho, caracterizando antagonismo entre esses óleos. Nota-se ainda que o óleo essencial de manjeriço apresenta redução dos halos de inibição quando variava-se as concentrações de tomilho, comprovando mais uma vez o antagonismo entre estes óleos quando testados conjuntamente contra a bactéria *E. coli*.

O uso da combinação de substâncias bioativas no combate de microrganismos tem sido reconhecidamente empregado nas últimas décadas, sendo fonte de estudo de diversos autores (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Contudo dificilmente são encontrados trabalhos que relatam o sinergismo entre óleos essenciais, normalmente são encontrados textos que tratam da combinação entre óleos essenciais e medicamentos ou entre extratos e óleos ou até mesmo entre extratos de plantas.

Porém, alguns trabalhos mencionam dados interessantes sobre sinergismo e antagonismo de substâncias. Wagner e Ulrich-Merzenich (2009), em estudo sobre sinergismo entre substâncias bioativas, confirmam que a eficácia de combinações de drogas sintéticas é relativamente simples, porque eles usam misturas de substâncias puras, cuja farmacologia é na maioria dos casos conhecida. Além disso, vários exemplos de sinergia em farmacologia clássica já são conhecidos, embora seus mecanismos exatos ainda não tenham sido esclarecidos. Esse contexto não pode ser empregado a misturas de substâncias bioativas como os óleos essenciais uma vez que cada óleo pode apresentar dezenas de componentes e assim gerar milhares de combinações.

Quando analisados os halos de inibição em ambos os gráficos, nota-se que o aumento da concentração de óleo essencial de pimenta de macaco promoveu a diminuição simultânea dos halos de inibição, para tomilho e manjerição juntos ou isoladamente, o que define a ação desse óleo como antagonista a tomilho e manjerição. Nas Figuras 6 e 7 é possível notar como os halos de inibição se apresentaram durante o experimento.

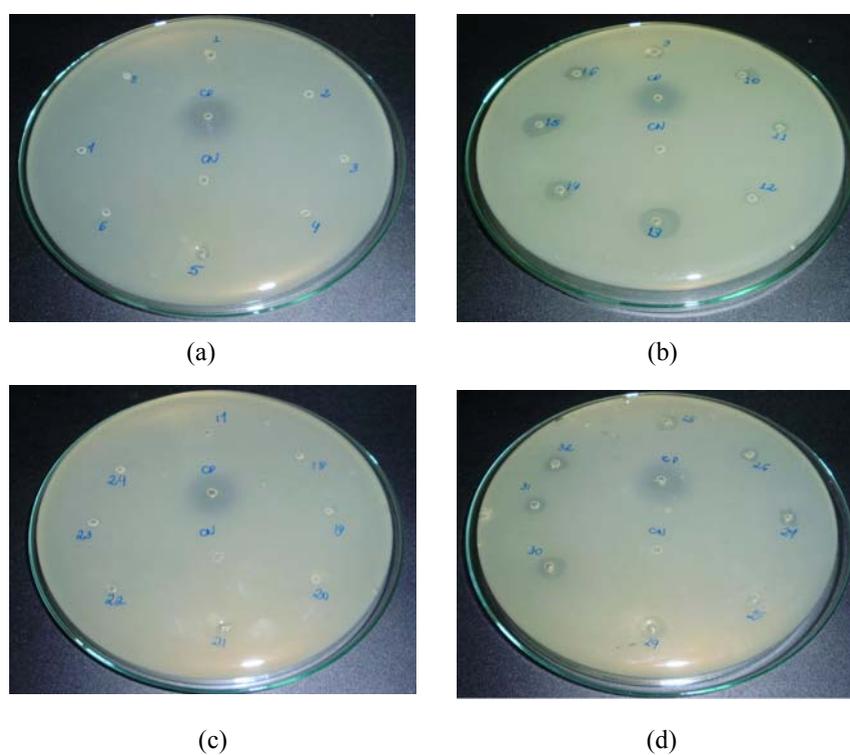


Figura 6 Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjerição e pimenta de macaco combinados contra *E. coli* – (a) tratamentos 1 a 8, (b) tratamento 9 a 16, (c) tratamentos 17 a 24 e (d) tratamentos 25 a 32

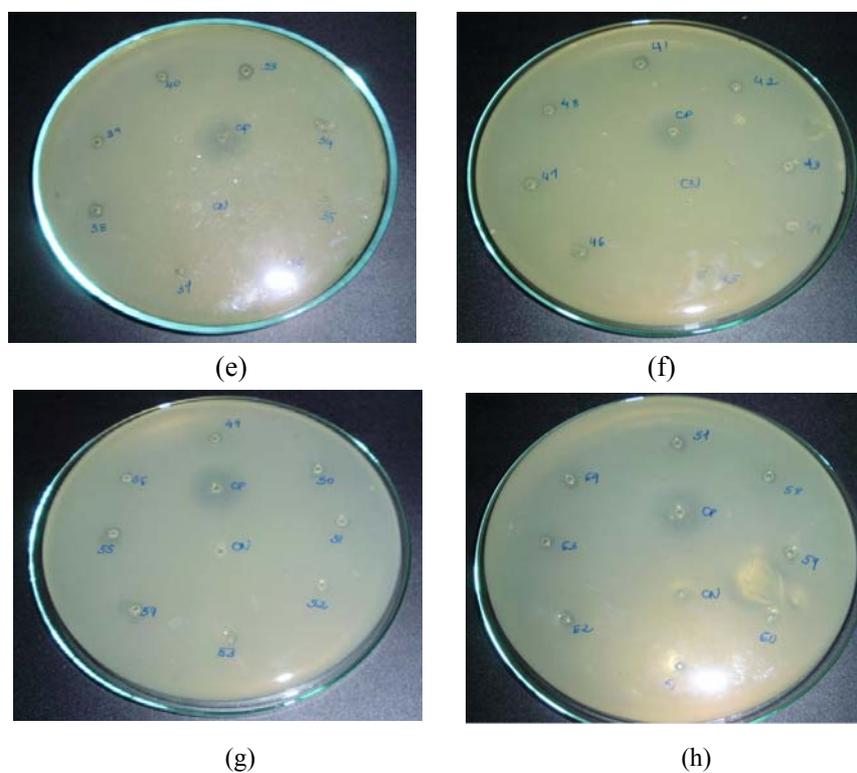


Figura 7 Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjeriçã e pimenta de macaco combinados contra *E. coli* – (e) tratamentos 33 a 40 (f) tratamentos 41 a 48, (g) tratamentos 49 a 56 e (h) tratamentos 57 a 64

#### 4.3.2 Atividade antimicrobiana sinérgica de óleo essencial de tomilho, manjeriçã e pimenta de macaco frente à *Salmonella enteritidis*

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de halos médios para os respectivos tratamentos, bem como as concentrações de óleos empregadas em cada tratamento.

Tabela 9 Porcentagem de óleos essenciais para os tratamentos e média de halos da atividade antimicrobiana *Salmonella enteritidis*

Trat.	% Óleos Essenciais			Média de Halos em mm	Trat.	% Óleos Essenciais			Média de Halos em mm
	Manj.	Tom.	P. Mac.			Manj.	Tom.	P. Mac.	
1	0	0	0	0,00	33	12,5	0	0	3,67
2	0	0	6,25	0,00	34	12,5	0	6,25	3,50
3	0	0	12,5	1,83	35	12,5	0	12,5	4,17
4	0	0	25	3,00	36	12,5	0	25	0,67
5	0	0,4	0	2,83	37	12,5	0,4	0	3,00
6	0	0,4	6,25	3,50	38	12,5	0,4	6,25	3,33
7	0	0,4	12,5	0,00	39	12,5	0,4	12,5	3,50
8	0	0,4	25	0,00	40	12,5	0,4	25	3,33
9	0	3,13	0	4,83	41	12,5	3,13	0	4,17
10	0	3,13	6,25	3,50	42	12,5	3,13	6,25	2,50
11	0	3,13	12,5	3,17	43	12,5	3,13	12,5	3,33
12	0	3,13	25	1,67	44	12,5	3,13	25	2,17
13	0	12,5	0	9,83	45	12,5	12,5	0	5,00
14	0	12,5	6,25	7,00	46	12,5	12,5	6,25	4,33
15	0	12,5	12,5	5,33	47	12,5	12,5	12,5	3,33
16	0	12,5	25	4,50	48	12,5	12,5	25	4,00
17	3,13	0	0	0,00	49	25	0	0	3,33
18	3,13	0	6,25	0,00	50	25	0	6,25	2,33
19	3,13	0	12,5	0,00	51	25	0	12,5	2,83
20	3,13	0	25	0,00	52	25	0	25	1,33
21	3,13	0,4	0	2,50	53	25	0,4	0	3,50
22	3,13	0,4	6,25	1,33	54	25	0,4	6,25	4,67
23	3,13	0,4	12,5	1,50	55	25	0,4	12,5	4,67
24	3,13	0,4	25	0,00	56	25	0,4	25	3,17
25	3,13	3,13	0	3,67	57	25	3,13	0	14,33
26	3,13	3,13	6,25	2,50	58	25	3,13	6,25	13,67
27	3,13	3,13	12,5	2,33	59	25	3,13	12,5	6,50
28	3,13	3,13	25	4,50	60	25	3,13	25	6,17
29	3,13	12,5	0	7,83	61	25	12,5	0	3,67
30	3,13	12,5	6,25	5,17	62	25	12,5	6,25	5,67
31	3,13	12,5	12,5	5,67	63	25	12,5	12,5	8,33
32	3,13	12,5	25	4,00	64	25	12,5	25	5,00

Trat. = tratamento; Manj. = manjeriçã; Tom. = tomilho; P. Mac. = pimenta de macaco

Nos experimentos de sinergismo realizados para *Salmonella enteritidis*, mostrados na Figura 8, é possível observar que o óleo essencial de pimenta de macaco mostrou novamente efeito antagonista quando combinado aos óleos essenciais de tomilho e manjerição.

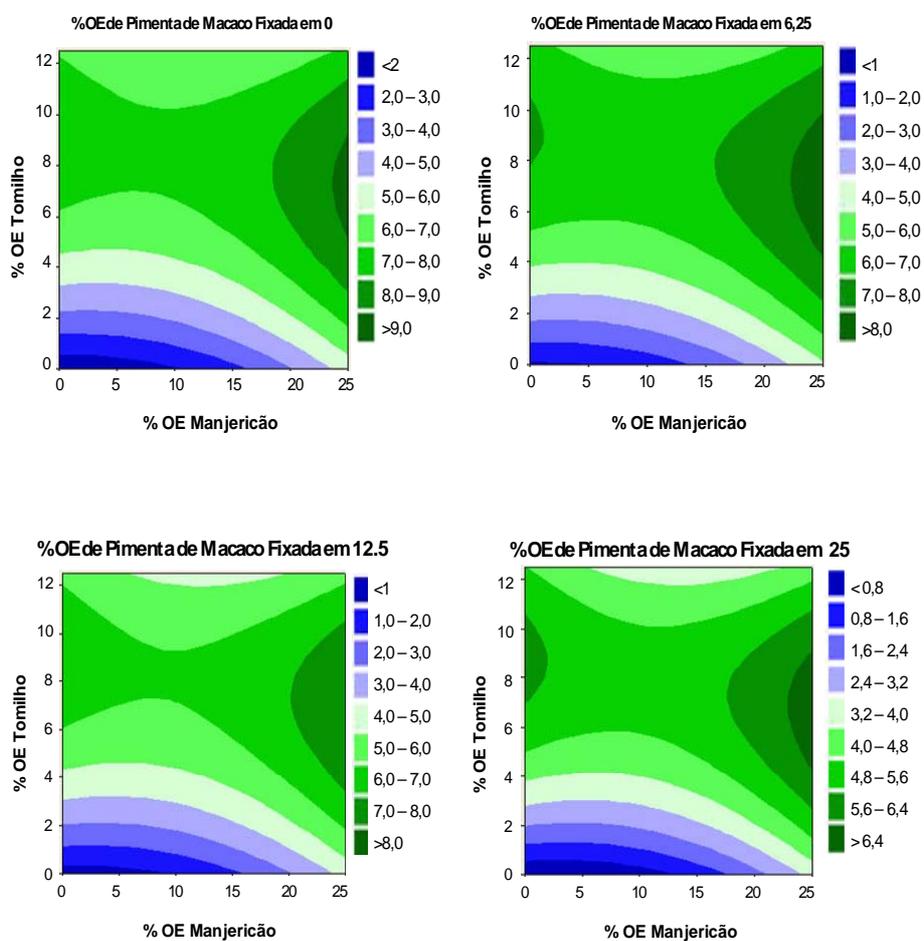


Figura 8 Superfície de resposta para halos de inibição expressos em mm das combinações de óleos essenciais contra *Salmonella enteritidis*

Os halos de inibição diminuíram quando comparados entre as mesmas concentrações em todos os gráficos. Nota-se ainda que o óleo essencial de tomilho apresentou atividade sinérgica ao óleo de manjerição, potencializando o efeito antimicrobiano do mesmo até concentrações de aproximadamente 10%. Após essa concentração verificou-se a diminuição da atividade antimicrobiana, caracterizando antagonismo; este fato ocorreu em todas as concentrações de óleo essencial de *Piper aduncum* (fixadas por gráfico) em todos os gráficos, observação evidenciada pelas zonas verdes mais escuras.

Sabe-se que o efeito sinérgico de uma mistura seja ela de produtos naturais combinados entre si ou de produtos naturais combinados com drogas sintéticas exige estudos mais profundos a fim de se isolar os componentes que efetivamente promovem o efeito desejado e a partir de então estabelecer relações mais coesas sobre atividade e substância. Contudo a investigação prévia de mecanismos sinérgicos ou antagônicos existentes entre produtos naturais norteia pesquisas sobre possíveis possibilidades de aplicação de produtos como óleos essenciais (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

No presente estudo foi possível verificar que a complexidade dos óleos essenciais permite uma ampla discussão sobre o seu uso concomitante. Para se obter um real sinergismo, Wagner e Ulrich-merzenich (2009) alertam para a importância da comparação entre os componentes isolados de uma mistura e sua dose equivalente nesta.

Neste sentido, entende-se por sinergismo o aumento significativo de atividade terapêutica (antimicrobiana) de uma determinada substância, redução de efeitos adversos como mudança de sabor e/ou diminuição de efeitos colaterais quando comparada a solução individualmente. Os autores citam ainda que embora testes para obtenção desses resultados de sinergismo sejam caros e demandem tempo existem alguns poucos estudos que relatam e comprovam sua existência.

Williamson (2001) inferiu em seu estudo que entre produtos naturais e fitoterápicos é perfeitamente possível que haja interação sinérgica entre combinações de determinada doses e antagonismo em outras concentrações dos mesmos produtos. Estas observações confirmam os resultados obtidos neste estudo, em que os óleos de tomilho e manjerição agiram conjuntamente em concentrações mais baixas e antagonicamente quando a concentração de tomilho é aumentada.

Essa observação pode ser justificada pelo fato dos mecanismos de ação dos componentes de um óleo nem sempre serem descritos para todas as substâncias químicas presentes. O desconhecimento das atividades químicas e biológicas destes componentes pode causar diversas interpretações, uma vez que em concentrações maiores outros componentes químicos pouco discutidos pela literatura podem exercer papel inibidor de substâncias comprovadamente ativas.

Nas Figuras 9 e 10 é possível notar como os halos de inibição se apresentaram durante o experimento.

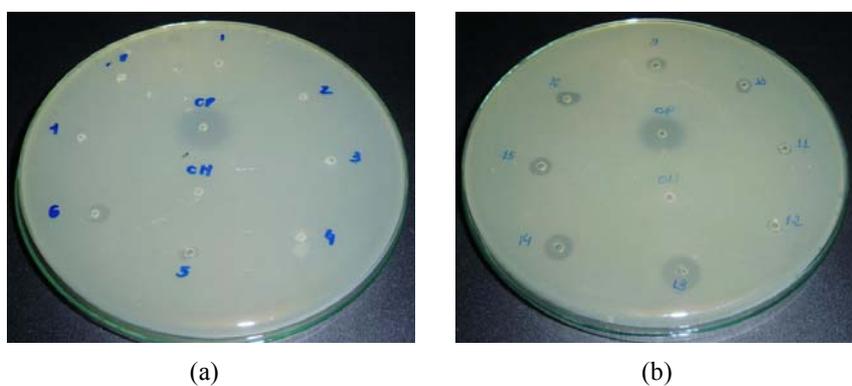


Figura 9 Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjerição e pimenta de macaco combinados contra *Salmonella enteritidis* – (a) tratamentos 1 a 8 e (b) tratamento 9 a 16

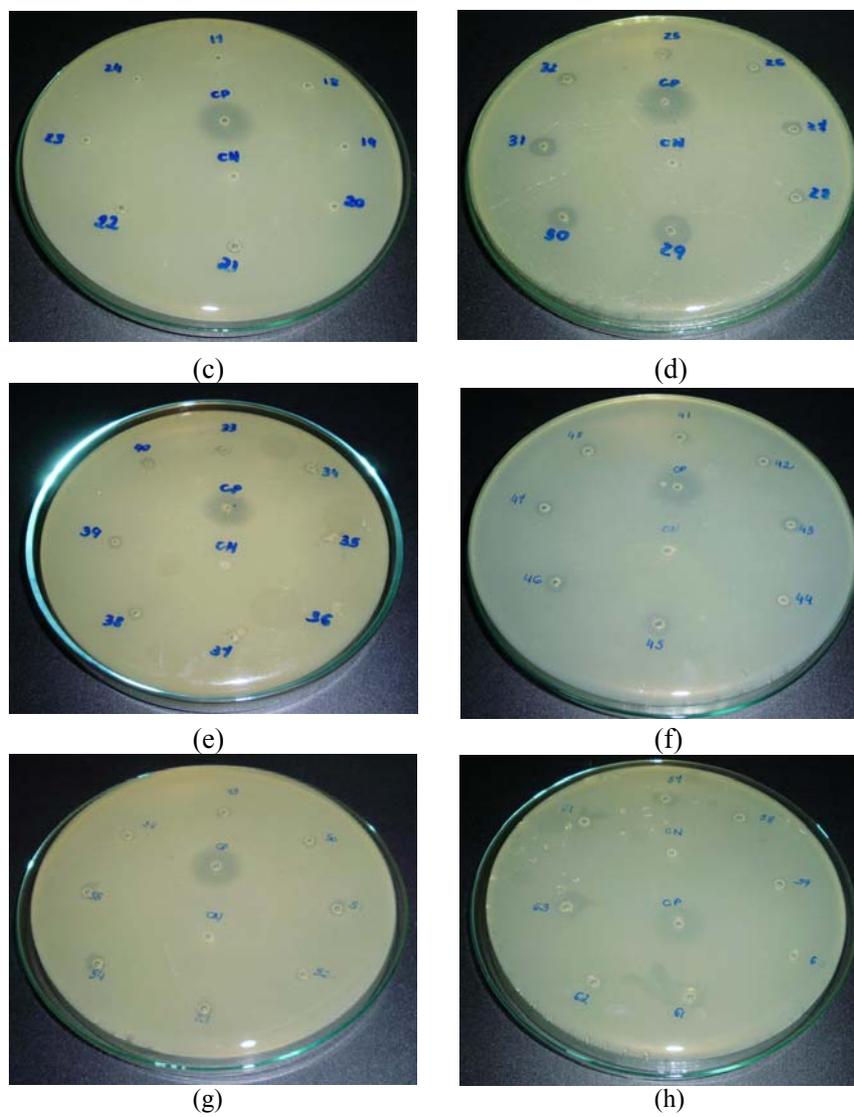


Figura 10 Fotos da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco combinados contra *Salmonella enteritidis* – (c) tratamentos 17 a 24 e (d) tratamentos 25 a 32, (e) tratamentos 33 a 40 (f) tratamentos 41 a 48, (g) tratamentos 49 a 56 e (h) tratamentos 57 a 64

### 4.3.3 Atividade antimicrobiana de óleo essencial de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco frente à *S. aureus*

Os mesmos testes de sinergismo foram aplicados para o *S. aureus*, contudo este microrganismo não apresentou comportamento significativo quando submetido aos óleos essenciais em estudo de forma conjunta. Portanto para descrição dos resultados foi necessária a avaliação isolada das variáveis que não apresentaram correlação. As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores de média observada e estimada em mm para os halos de inibição promovidos pelo óleo essencial de manjeriço e tomilho.

Tabela 10 Desdobramento entre concentração de óleo essencial de manjeriço e tamanho dos halos de inibição para *S. aureus* expressos em mm

Concentração %	Média Observada	Média Estimada
0	3,44	3,10
3,13	3,76	3,38
12,5	2,92	4,26
25	6,04	5,42

CV (%) = 100,72/ R<sup>2</sup> = 57.24%

Tabela 11 Desdobramento entre concentração de óleo essencial de tomilho e tamanho dos halos de inibição para *S. aureus* expressos em mm

Concentração %	Média Observada	Média Estimada
0	2,47	3,49
3,13	4,35	3,54
12,5	4,24	3,92
25	5,09	5,20

CV (%) = 100,72/ R<sup>2</sup> = 51.24%

Nas tabelas 10 e 11 é possível observar que houveram níveis de significância apenas para os halos de inibição referentes aos óleos essenciais de manjerição e tomilho, analisados de maneira isolada, não apresentando interação entre eles e tampouco com o óleo essencial de pimenta de macaco.

## 5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de tomilho, manjeriço e pimenta de macaco mostraram atividade antimicrobiana isoladamente contra as bactérias *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *S. aureus*. O óleo essencial de tomilho foi aquele que exibiu o maior potencial antimicrobiano e o de pimenta de macaco demonstrou o menor efeito.

Houve interação entre os óleos essenciais quando submetidos a testes contra *E. coli* e *Salmonella enteritidis*, sendo que a interação manteve caráter antagonico para *E. coli* em todas as concentrações de estudo e caráter sinérgico e antagonico para *Salmonella enteritidis*. quando variou-se as concentrações dos óleos testados. Para o *S. aureus* não foi possível verificar diferença significativa quando este foi submetido a ensaios de interação entre os óleos essenciais.

Os óleos essenciais obtidos apresentaram rendimento satisfatório e condizentes com dados da literatura, variando apenas a porcentagem de cada componente.

Os componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais foram timol, carvacol, o-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e linalol (tomilho), linalol, 1,8-cineol e eugenol (manjeriço) e linalol, (E) nerolidol e óxido de cariofileno (pimenta de macaco).

## REFERÊNCIAS

- AERTS, R. J. et al. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids? **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 2947-2951, Sept. 1991.
- BARA, M. T. F. **Avaliação do efeito inibidor de condimentos no desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica***. 1992. 73 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1992.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *P. aduncum* sobre *Crinipellis perniciosus* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 3, n. 22, p. 441-443, set./out. 1997.
- BELAICHE, T.; TANTAOU-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sciences des Aliments**, Versailles, v. 15, n. 6, p. 571-578, June 1995.
- BIZZO, H.; HOWELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, mar. 2009.
- 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.
- BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 611 p.
- CELIK TAS, O.Y. et al. Antimicrobial activity of methanol extracts and essential oils of *rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 100, n. 2, p. 553-559, Apr. 2007.
- CORREA, J. C. et al. **Cultivo de plantas medicinais condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 1994.
- CORREA, 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) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2000.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. cap. 24, p. 1250-1318.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. CG/EM analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, May 2000.

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

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, v. 2, n. 7, p. 1-16, out. 2006.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, July 2001.

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

FERNANDES, P. C. et al. Cultivo de manjerição em hidroponia e em diferentes substratos sob ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 260-264, abr./jun. 2004.

FERREIRA, T. M. et al. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Cândida* obtidas de ambiente hospitalar. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE IC E DE PÓS GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, 5., 2002, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos:UNIVAP, 2002. p. 498-501.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 4, p. 33-82.

FURTADO, R. F. et al. Atividade larvívica de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 5, p. 843-847, out. 2005.

GAIO, I. **Atividade antimicrobiana e antioxidante in vitro e em salame tipo italiano do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum Basilicum L.*)**. 2008. 141 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI, Erechim, 2008.

GELINSKI, J. M. L. N. et al. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 131-144, jul./dez. 2007.

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

GUERREIRO, M.; DIAS, M. G. L. **O papel das ervas aromáticas e das especiarias na seleção natural da espécie humana**. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia, 1999.

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

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products. In: WALTON, N. J.; BROWN, D. E. **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London: Imperial College, 1999. cap.1, p. 1-25.

HSIEH, P.C.; MAU, J. L.; HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 35-43, Feb. 2001.

ISMAIEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33a, 40b and 1623e by essential oil of spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, June 1990.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

- LI, J. et al. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 5, n. 2, p. 171-179, Feb. 1993.
- LIMA, E O.; FARIAS, N. M. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 3, n. 1, p. 51-64, jan./mar. 1999.
- LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 220p.
- MAZUTTI, M. et al. Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO<sub>2</sub> a altas pressões. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1198-1202, nov./dez. 2006.
- MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 316-320, out./dez. 2005.
- MONTEIRO, G.M. et al. Acute and subacute toxicity of the essential oil of *Piper aduncum*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Shannon, v. 13, n. 2, p. 153-159, May 2001.
- MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 38, n. 5, p. 565-570, May 2005.
- MOTA, M. G. C. et al. Coleta de germoplasma e distribuição geográfica de *Piper aduncum* L. na Amazônia Brasileira. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS DA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRGEALC, 2001. p. 1-4.

MURRAY, R. et al. **Microbiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762 p.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul, em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 47-51, jan. 2004.

NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 5, p. 675-678, set. 1999.

NASCIMENTO G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, out. 2000.

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

NOLASCO, F. **Deficiências nutricionais em manjeriço (*Ocimum* spp.) sob hidroponia**. 1996. 19 p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

NOVACOSK, R.; TORRES, R. S. L. A. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Malaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Tymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, São Paulo, v. 21, n. 21, p. 36-39, fev./mar. 2006.

NTEZURUBANZA, L.; SCHEFFER, J. J. C.; SWENDSEN, A. B. Composition of the essential oil of *Ocimum gratissimum* grown in Rwanda. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 53, n. 5, p. 421-423, 1987.

ORJALA, J. et al. Aduncamide, a cytotoxic and antibacterial beta-phenylethylamine-derived amide from *Piper aduncun*. **Journal of Natural Products**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 231-236, Mar. 1993.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 414-420, June 2007.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 3 p. 624-632, jul./set. 2007.

PIMENTEL, F. A. et al. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum*. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 523-526, maio/jun. 2008.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: USP/ESALQ, 2000. 477 p.

PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 205p.

POKRYWIECKI, J. C. **Fracionamento do óleo essencial de manjeriço de cheiro (*Ocimum basilicum*) com membranas em meio supercrítico para concentração do linalol com reciclo do solvente no processo de extração**. 2006. 175p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

PORTE, A., GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, jul./dez. 2001.

PRATES, H. T. et al. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 193-197, abr. 1998.

RODRIGUES, K. L. et al. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 297-299, jan./fev. 2004.

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

SANTOS, R. S. I. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM do óleo essencial de *Thymus vulgaris* sobre *Streptococcus mutans* e caracterização química do óleo por cromatografia gasosa. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11.; ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE IC E DE PÓS GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA, 7., 2007, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: UNIVAP, 2007. p. 1537-1540.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, maio/jun. 2007.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, Connecticut, v. 6, n. 1, p. 29-44, Aug. 1983.

SILVA, A. C. P. R.; OLIVEIRA, M. N. **Caracterização botânica e química de três espécies do gênero *Piper* no Acre**. Acre: EMBRAPA, 2000. 13 p. (Boletim de Pesquisa, 23).

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2010.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 136-141, maio 2010.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em Alimentos**. 5. ed. São Paulo: Varela. 2002. 479 p.

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

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 41-45, mar. 2006.

TORRAS, J. et al. Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Barcelona, v. 87, n. 12, p. 2327-2333, Sept. 2007.

TORRES, C. R. G. et al. Agentes antimicrobianos e seu potencial na odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia São Jose dos Campos**, São José dos Campos, v. 3, n. 2, p. 43-52, jul./dez. 2000.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 824p.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, jul./set. 2009.

ULTEE, A. et al. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, New York, v. 174, n. 4, p. 233-238, Apr. 2000.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan./fev. 2004.

VILA R. et al. Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 20, n. 1, p. 67- 69, Jan./Feb. 2005.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 16, n. 2, p. 97-110, Mar. 2009.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 8, n. 5, p. 401-409, Sept. 2001.