

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA,
MANJERONA E ANIS-ESTRELADO:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE
Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*,
Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus***

JULIANA MESQUITA FREIRE

2008

JULIANA MESQUITA FREIRE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, MANJERONA E ANIS-
ESTRELADO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA SOBRE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus
flavus* e *Aspergillus parasiticus***

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

Orientadora

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

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

Freire, Juliana Mesquita.

Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* / Juliana Mesquita Freire. – Lavras : UFLA, 2008.

68 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Anetol. 3. 4-terpineol. 4. Aldeído cinâmico. 5. Microrganismos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

JULIANA MESQUITA FREIRE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, MANJERONA E ANIS-
ESTRELADO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA SOBRE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus
flavus* e *Aspergillus parasiticus***

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

APROVADA em 07 de março de 2008

Dr. Flávio Araújo Pimentel

EMBRAPA

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

UFLA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ao meu pai, **Jander**, (*in memoriam*) pelo exemplo de perseverança e luta em busca dos sonhos. Será eternamente a minha maior inspiração.

DEDICO

À minha mãe, **Daurene**, por estar sempre presente, apoiando-me em todos os momentos.

Aos meus irmãos, **Ana Cláudia e Eduardo**, pelo apoio, compreensão e carinho. Aos meus queridos sobrinhos, **Luís Eduardo e Thiago**.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar energia, saúde, perseverança e força para a realização deste projeto.

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

Ao professor Luís Roberto Batista, pela co-orientação, consideração e atenção, sempre disponibilizando o Laboratório e materiais.

Aos professores Ruy Carvalho e Celeste Maria Patto de Abreu, pela compreensão, ensinamentos e pela amizade nas horas difíceis.

A todos os professores do Departamento de Química, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos.

Às colegas e amigas Milene e Rafaela, pelo companheirismo e pela colaboração na condução do experimento.

Aos colegas de Laboratório Jean, Fernando, Flávio, Ana Elisa, Lidiany, Cleusa, Felipe, Sara, Stefânia e Vanessa pela colaboração.

Ao Laboratório de Microbiologia. Em especial à Daiani, pela amizade e ajuda na condução do experimento.

Ao Departamento de Química, secretárias e funcionários, em especial à Miriam, Lílian e Xulita pela convivência.

Aos colegas de pós-graduação Simone, Luciana, Maria Cristina, Annete, Ellen e Denise, pela amizade e horas de estudo.

Ao Júnior, pela paciência, compreensão e amizade.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida.

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE SIMBOLOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEORICO.....	3
2.1 Plantas condimentares.....	3
2.1.1 Origanum majorona (manjerona).....	3
2.1.2 Illicium verum (Anis-estrelado).....	5
2.1.3 Cinnamomum zeylanicum (Canela)	7
2.2 Metabólitos secundários	9
2.2.1 Óleo essencial	12
2.2.1.1 Atividade biológica dos óleos essenciais.....	18
2.3 Microorganismos em alimentos.....	22
2.3.1 Staphylococcus aureus.....	23
2.3.2 Escherichia coli.....	24
2.3.3 Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Óleo essencial	28
3.1.1 Material vegetal	28
3.1.2 Extração do óleo essencial.....	28
3.1.3 Determinação da umidade	28
3.1.4 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	29

3.2 Atividade Microbiana dos Óleos Essenciais.....	30
3.2.1 Microrganismos utilizados.....	30
3.2.2 Manutenção das culturas e padronização.....	30
3.2.2.1 Bactérias	30
3.2.2.2 Fungos.....	31
3.2.3 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre E. coli e S. aureus.	31
3.2.4 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre A. flavus e A. parasiticus.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Óleos Essenciais	34
4.1.1 Rendimento.....	34
4.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	35
4.1.2.1 Origanum manjorona	35
4.1.2.2 Illicium verum.....	37
4.1.2.3 Cinnamomum zeylanicum	39
4.2 Atividade biológica.....	42
4.2.1 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre A. flavus e A. parasiticus.....	42
4.2.2 Atividade bactericida dos óleos essenciais sobre E. coli e S. aureus.....	48
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	63

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1	Rendimento dos óleos essenciais de <i>Origanum manjorona</i> , <i>Illicium verum</i> e <i>Cinnamomum zeylanicum</i> .. 34
TABELA 2	Composição química do óleo essencial de folhas secas manjerona 35
TABELA 3	Composição química do óleo essencial de anis-estrelado 38
TABELA 4	Composição química do óleo essencial de canela 40
TABELA 5	Valores médios do diâmetro do crescimento micelial de <i>A. flavus</i> em função da concentração..... 42
TABELA 6	Valores médios do diâmetro do crescimento micelial de <i>A. flavus</i> em função da concentração..... 43
TABELA 7	Valores médios do diâmetro do crescimento micelial de <i>A. parasiticus</i> em função da concentração 44
TABELA 8	Valores médios do efeito do óleo essencial de manjerona entre <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> 45
TABELA 9	Valores médios do efeito do óleo essencial de anis-estrelado entre <i>A. flavus</i> e <i>A. parasiticus</i> 46
TABELA 10	Valores médios do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado sobre o fungo <i>A. flavus</i> 47
TABELA 11	Valores médios do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre o fungo <i>A. parasiticus</i> 48
TABELA 12	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais sobre <i>S. aureus</i> 49

TABELA 13	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais sobre <i>E. coli</i>	50
TABELA 14	Valores médios do efeito do óleo essencial de manjerona entre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	51
TABELA 15	Valores médios do efeito do óleo essencial de canela entre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	52
TABELA 16	Resultados médios da avaliação do efeito sinérgico dos óleos essenciais estudados sobre a formação do halo de inibição de duas espécies de bactérias.....	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Aspecto geral da manjerona A) folhas fresca, B) folhas secas 04
FIGURA 2	Estrutura do 4-terpineol e cis-sabineno..... 05
FIGURA 3	Aspecto geral do anis-estrelado 06
FIGURA 4	Estrutura química do trans-anetol..... 06
FIGURA 5	Aspecto geral da canela A) casca e B) árvore..... 07
FIGURA 6	Estrutura química aldeído cinâmico e eugenol..... 08
FIGURA 7	Rota metabólica do metabolismo secundário 11
FIGURA 8	Representação básica de um fenilpropanóide 14
FIGURA 9	Estrutura química do isopreno 14
FIGURA 10	Biossíntese de terpenóides 15
FIGURA 11	Biossíntese dos fenilpropanoides 16
FIGURA 12	Representação da biossíntese dos terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS)..... 17
FIGURA 13	Estrutura química do pulegone e 1,8-cineol..... 19
FIGURA 14	Estruturas químicas do benzaldeído, álcool benzílico e benzoato de benzila..... 20
FIGURA 15	Estrutura do carvacrol, aldeído cinâmico e timol..... 20
FIGURA 16	Estruturas químicas citral, terpen-4-ol e eugenol..... 21
FIGURA 17	Estruturas químicas linalol e neral..... 22
FIGURA 18	Estrutura química das aflatoxinas..... 27
FIGURA 19	Cromatograma do óleo essencial de folhas secas de manjerona..... 36
FIGURA 20	Estrutura química do gama-terpineno..... 37
FIGURA 21	Cromatograma do óleo essencial de anis-estrelado..... 38

FIGURA 22	Estrutura química do limoneno.....	39
FIGURA 23	Cromatograma do óleo essencial de canela.....	40
FIGURA 24	Estrutura química do aldeído cinâmico.....	41

LISTA DE SIMBOLOS

BHT	Butil hidroxitolueno
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CO ₂	Gás carbônico
CZAPEK-DOS	Meio de cultura Czapeck acrescido de extrato de levedura
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril- Côa
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXPS	1deoxi-D-xilulose-5-fosfato
EMB	Eosina de azul de metileno
FDA	Food drug administration
DIC	Detector por ionização de chamas
IPP	Isopentil-pirofosfato
ISO	International Standard organization
K	Potássio
CMI	Concentração mínima inibitória
PAL	Fenilalanina amonialiase
PCA	Plate count agar
TSA	Tryptic soy agar

RESUMO

FREIRE, Juliana Mesquita. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *S. aureus*, *E. coli* e *A. flavus* e *A. parasiticus***. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A atividade microbiana é a principal causa de deteriorização de muitos alimentos e frequentemente é a responsável pela diminuição de sua qualidade e segurança. Recentemente, há um crescente interesse no uso de produtos naturais que substituam aditivos químicos, pois esses apresentam elevada toxicidade ao consumidor. Os condimentos possuem comprovada atividade antimicrobiana e, dessa forma, podem ser utilizados como conservantes em alimentos. Neste estudo, objetivou-se avaliar a constituição química e a atividade biológica dos óleos essenciais de *Origanum manjorona* (manjerona), *Illicium verum* (anis-estrelado) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela), utilizando o método de difusão cavidade placa ágar sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e para os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, observando-se o crescimento e/ou inibição micelial das culturas fungicas, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo). Para a identificação e quantificação dos constituintes químicos dos óleos, utilizou-se um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa e um cromatográfico gasoso com detector por ionização de chamas (DIC), respectivamente. Os constituintes dos óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela foram o 4-terpineol, trans-anetol e aldeído cinâmico, respectivamente. Nos resultados dos testes *in vitro*, os óleos essenciais de manjerona e canela promoveram efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; porém, o óleo de canela apresentou melhor efeito inibitório nas menores concentrações. Já o óleo essencial de anis-estrelado apresentou atividade apenas com *Escherichia coli*. O efeito inibitório dos óleos de manjerona, anis-estrelado e canela foi efetivo sobre os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A concentração mínima inibitória para o crescimento micelial do *Aspergillus parasiticus* foi de 1 e 0,01 µL/mL para os óleos de anis-estrelado e canela, respectivamente. Já a concentração mínima inibitória para o *Aspergillus parasiticus* foi de 0,25; 2 e 2 µL/mL para os óleos de canela, anis-estrelado e manjerona, respectivamente. Para o efeito sinérgico dos óleos sobre as bactérias e fungo, não foram observadas diferenças, quando comparados com o efeito individual. Foi possível

*Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Orientadora) e Luis Roberto Batista – UFLA (Co-orientador)

verificar que os óleos em estudo apresentaram efeito inibitório sobre os microrganismos estudados, podendo ser considerados, portanto, como uma alternativa no controle microbiológico de alimentos.

ABSTRACT

FREIRE, Juliana Mesquita. **Essential oils of cinnamon, manjorona and star anise: chemical characterization and biological activity on *S. aureus*, *E. coli*, *A. flavus* and *A. parasiticus***. 2008. 68 p. Dissertation (Master Degree: Agrochemistry) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The microbial activity is the main cause for deterioration of lots of food and frequently it's in charge of decreasing quality and safety. Recently, it's had a big interest in the use of natural products that substitute chemical additives once they have high toxicity to the consumer. The spices have a proven antimicrobial activity; therefore can be used as food preservatives. The objective of this study was to evaluate the chemical composition and biological activity of essential oils, such as *Origanum manjorona*, *Illicium verum* and *Cinnamomum zeylanicum*, using the method of agar diffusion slide plate on bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and for fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, observing the growth and/or inhibited mycelial of fungal cultures, by comparing with standard plate (without oil). For identification and quantification of the oils chemical constituents, it was used a gas chromatographic based on a mass spectrometer and a gas chromatographic with flame ionization detection (FID), respectively. The constituents of the essential oils, such as manjorona, star anise and cinnamon were: 4-terpineol, trans-anetol and cinnamic aldehyde, respectively. In the results of *in vitro* tests, manjorona and cinnamon essential oils promoted inhibitory effect on bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; however, cinnamon oil had a better inhibitory effect on smaller concentrations. On the other hand, *Illicium verum* essential oil just had some reaction faced with *Escherichia coli*. The inhibitory effect of essential oils, such as *Origanum manjorona*, *Illicium verum* and *Cinnamomum zeylanicum*, was effective on fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The minimum inhibitory concentration for mycelial growth of *Aspergillus parasiticus* was of 1 and 0, 01 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for *Illicium verum* and *Cinnamomum zeylanicum*, respectively. The minimum inhibitory concentration for *Aspergillus parasiticus* was of 0, 25; 2 and 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for *Cinnamomum zeylanicum*, *Illicium verum* and *Origanum manjorona*, respectively. For synergistic effect of the oils on the bacteria and fungi, differences were not observed when compared to the individual effect. It was possible to verify that the studied oils had inhibitory effect on the studied

*Orienting Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Advisor) e Luis Roberto Batista– UFLA (Co-advisor)

microorganisms; therefore, considered an alternative for the microbiological control of food.

1 INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade, o homem procurou conhecer as plantas e suas propriedades medicinais. Baseando-se em descobertas casuais e que atualmente estão sendo comprovadas pela ciência, elas foram utilizadas para a cura de doenças, para a conservação de alimentos e controle de insetos.

Em toda parte da planta podem ser encontradas substâncias ativas importantes, sintetizadas a partir do metabolismo primário, destacando-se os óleos essenciais, considerados como principais componentes bioquímicos de ação terapêutica nas plantas condimentares.

Os óleos essenciais são compostos voláteis extraídos dos vegetais por diferentes técnicas, são importantes no controle fitossanitário e propiciam o desenvolvimento de outras técnicas, as quais procuram diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos que causam prejuízos nas indústrias alimentícias (Pereira, 2006).

Atualmente, consumidores exigem o uso de alimentos naturais, com baixo nível de aditivos químicos, os quais, muitas vezes, possuem agentes carcinogênicos e possuem uma vida de prateleira longo. A própria legislação de alimentos tem restringido o uso de certos antimicrobianos sintéticos, com base na possibilidade de toxicidade. Dessa forma, a pesquisa fitoquímica apresenta-se como um método útil, utilizando técnicas analíticas e instrumentais que permitem o isolamento e a elucidação de inúmeros compostos. Sendo assim, os óleos essenciais encontrados em plantas condimentares têm despertado o interesse nas indústrias alimentícias, por apresentarem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, tornando o estudo do efeito inibitório desses óleos em microrganismos uma alternativa para a redução do uso de aditivos químicos em alimentos.

Entre as espécies aromáticas, o *Illicium verum*, o *Origanum majorana* e o *Cinnamomum zeylanicum*, conhecidos popularmente por anis-estrelado, manjerona e canela, respectivamente, apresentam inúmeras atividades biológicas, reflexos da sua diversidade química. Entre outros componentes, destacam-se o anetol (anis-estrelado), 4-terpineol (manjerona) e aldeído cinâmico (canela). As indústrias de alimentos estão explorando os óleos essenciais dessas plantas, por possuírem comprovada atividade antibacteriana e antifúngica.

Assim, com o presente trabalho objetivou-se analisar a composição química dos óleos essenciais de o *Illicium verum*, *Origanum majorana* e *Cinnamomum zeylanicum*, bem como seu efeito inibitório e sinérgico sobre o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 Plantas condimentares

O homem tem utilizado as plantas, desde os primórdios, na alimentação, na cura de doenças e também na agricultura. Os egípcios as utilizavam na cosmetologia, medicina e para mumificação de corpos. Elas foram largamente empregadas também pelos chineses, indianos, hebreus, árabes, gregos e romanos.

As plantas condimentares são definidas como produtos aromáticos de origem vegetal, utilizadas com a finalidade principal de temperar alimentos (FDA citado por Dziezak, 1989). Os condimentos também possuem propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. De acordo com Shelef (1983), existem aproximadamente 70 tipos de condimentos cultivados e utilizados em todo mundo. Esses exercem maior atração para o consumo na alimentação humana, por reunir características como sabor, aroma e aspecto capazes de estimular poderosamente os sentidos do corpo e influenciar o apetite. Cada uma delas desempenha uma tarefa específica, combinando aroma e sabor, de acordo com a finalidade desejada (Salgado, 2005).

2.1.1 *Origanum majorona* (manjerona)

Origanum majorona é conhecida como manjerona, manjerona-doce, manjerona-verdadeira. Espécie da família das Lamiaceae é uma planta herbácea nos climas nórdico, com folhas verde-claras de aroma agridoce e flores brancas ou púrpuras que se inserem em fascículos; apresenta uma altura que varia de 15 – 60 cm e cresce em forma de touceiras (Figura 1) (Cardoso, 2005).



(A)



(B)

FIGURA 1- Aspecto geral da manjerona A) folhas frescas, B) folhas secas

É originária das áreas naturais do Egito e leste do Mediterrâneo, cultivada em solo arejado, seco, alcalino e rico em nutrientes, preferindo clima tropical, quente e úmido. A melhor época para o plantio é o inverno (Vera et al. 1999).

Tradicionalmente, essa planta é usada na medicina como estimulante do aparelho digestivo, no combate às cólicas, gases e gastrite. Seu chá combate a úlcera estomacal e alivia as cólicas menstruais. Na inalação, ajuda a eliminar o muco das gripes, prevenindo a sinusite (Hertwig, 1991).

O óleo essencial de manjerona é de cor amarela, com odor picante, canforáceo e amadeirado. É utilizado para combater a tosse, problemas na bexiga e cólicas gastrointestinais. É também conhecido pelas propriedades antimicrobianas e inseticidas. Na culinária, é empregado em molhos para carnes, enlatados e aplicado para introduzir um sabor fresco, levemente aromático-medicinal e uma nota quente. O óleo essencial das folhas é volátil, podendo ser obtido pela técnica arraste a vapor de água, apresentando o 4-terpineol (38%) como composto majoritário, seguido do cis-sabineno (15%) e para-cimeno (7%) (Figura 2) (Vera et al. 1999; Grossman, 2005).

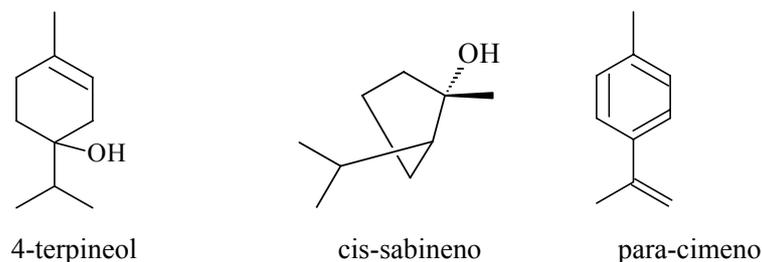


FIGURA 2 - Estrutura química do 4-terpineol, cis-sabineno e para-cimeno.

Pesquisas de Jun et al. (2001), verifica-se que o óleo de manjerona apresentou eficiente como antioxidante, tanto que essa propriedade foi comparada à conhecida atividade da vitamina E (α -tocoferol) e BHT.

2.1.2 *Illicium verum* (Anis-estrelado)

O anis-estrelado é uma planta nativa da Ásia Menor, Ilhas Gregas e Egito e utilizada desde a antigüidade. É conhecido popularmente no Brasil como anis-da-china e badiana (Negraes, 2003, Grossman, 2005).

Trata-se de uma planta arbórea ou arbustiva, de ciclo perene, que pode atingir de 2,5 a 4 metros de altura. O tronco é ereto, homogêneo, com casca lisa e madeira branca. As folhas são inteiras, lanceoladas e verdes; as flores são brancas a levemente creme, agrupadas em inflorescência do tipo umbela. O fruto é marrom, deiscente, pedunculado e possui oito carpelos em formato de barco e que, juntos formam uma estrela (Figura 3). As sementes são ovais e marrom-amareladas (Negraes, 2003).



FIGURA 3 - Aspecto geral do anis-estrelado.

Seu óleo essencial é tradicionalmente usado pelas propriedades carminativas, antiespasmódicas, expectorantes, estimulantes e bactericidas (Grossma, 2005).

Tuan & Ilangantileke (1997), analisando a composição química do óleo essencial de anis-estrelado obtido por arraste a vapor d'água e CO₂ supercrítico, observaram que não houve diferença significativa entre eles, apresentando como constituinte majoritário o trans-anetol (Figura 4), com 92,2% para o método convencional de extração e 89% para o CO₂ supercrítico.

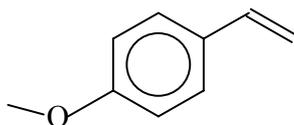


FIGURA 4- Estrutura química do trans-anetol.

Recentemente, Roopa et al. (2007), estudando a atividade antioxidante do óleo essencial e de seus extratos em diferentes métodos (peroxidação do ácido linoléico, linoleato de β -caroteno e DPPH), observaram que em todas

essas metodologias o anis-estrelado apresentou forte atividade antioxidante. Identificaram o trans-anetol (94%) como composto majoritário, seguido de limoneno (1%).

2.1.3 *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)

A espécie *Cinnamomum zeylanicum* (Figura 5) é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lauraceae, originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. É encontrada e conhecida no Brasil como canela-da-índia e canela-do-ceilão. O Brasil importa regularmente de diferentes países quantidades significativas tanto de cascas quanto do óleo essencial, dada a ausência de cultivo comercial dessa especiaria no País. É uma das mais antigas especiarias conhecidas. Seu uso é relatado desde os tempos bíblicos e o controle de seu comércio foi um dos motivos das grandes explorações marítimas. (Kotetsu et al. 1997, Lima et al. 2005).



FIGURA 5 - Aspecto geral da canela casca (A) e árvore (B).

É uma árvore perene, alcançando alturas de 8-17 m, suas folhas são perfumadas de cor verde-escuro, sendo a parte inferior mais clara. As flores são amarelas e pequenas, transformando-se posteriormente em bagas de cor púrpura-escuras. O clima e as condições do solo afetam a planta profundamente, de

modo que uma mesma espécie ou variedade, cultivada em outro país, pode produzir uma casca de qualidade muito diferente daquela obtida nas regiões da Índia (Kotetsu et al. 1997).

O óleo essencial da canela pode ser obtido tanto das cascas como das folhas, mas a composição dos dois é completamente distinta. O óleo obtido da casca é utilizado na aromatização de alimentos, ao passo que o das folhas na cosmética e na aromaterapia. O óleo presente na casca é de cor amarelo-amarronzada. É usado por seus efeitos antiespasmódicos, antiinflamatório, antipirético, carminativo, antibacteriano, anti-séptico, larvicida, mio-relaxante, sedante, anti-hipertensivo e inseticida (Grossman, 2005).

Koketsu et al. (1997), encontraram no óleo essencial da casca a presença do aldeído cinâmico (55%), seguido do eugenol (12%). Ao analisar as folhas da canela, encontraram o eugenol (94%) como composto majoritário e traços de aldeído cinâmico (1%) (Figura 6).

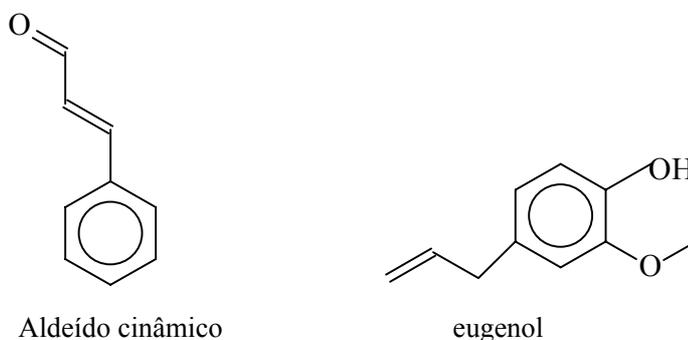


FIGURA 6 - Estrutura química aldeído cinâmico e eugenol.

2.2 Metabólitos secundários

Metabolismo é definido como o conjunto das transformações das moléculas orgânicas, catalizadas por enzimas específicas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado. Os compostos formados, degradados ou simplesmente transformados são chamados de metabólitos e as reações envolvidas são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação. Essas reações ocorrem em uma certa direção devido à presença das enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas. Essas são interconectadas, e as rotas que sintetizam metabólitos primários fornecem moléculas que são utilizadas como precursoras nas principais rotas de síntese de metabólitos secundários. Dessa forma, a divisão de metabólitos é uma forma de agrupar compostos com determinadas características em comum. Os processos metabólicos relacionados com a síntese e utilização de espécies químicas essenciais para a sobrevivência dos organismos têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário, constituído por celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias (Castro et al., 2004; Santos R., 2004).

Os compostos orgânicos produzidos ou transformados pelos vegetais que não possuem ação direta conhecida em seus processos vitais, tais como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos são conhecidos como metabólitos secundários (Guimarães, 2007). São biossintetizados somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, devido ao grau de diferenciação e desenvolvimento deles, podendo, em alguns casos, a produção estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento vegetal ou de determinadas condições ecológicas ou ambientais. Os tipos de metabólitos secundários são específicos de algumas espécies e/ou famílias (Pimentel, 2007).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção, sem utilidade biológica. Atualmente, sabe-se que esses compostos estão envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio, atuando, por exemplo, na defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (Harbone, 1993; Wink, 1990).

De acordo com Simões & Spitzzer (2004), a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 7). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, tais como: taninos hidrolisáveis, alcalóides derivados dos aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina/tirosina) e os fenilpropanóides. A combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato origina as antraquinonas, flavonóides e os taninos condensados. Os derivados do acetato podem ser produzidos pela via ciclo do ácido cítrico, dando origem aos alcalóides derivados dos aminoácidos alifáticos ornitina e lisina e aos glicosídeos e glicosinolatos; pela via do mevalonato, originam os derivados do isopreno e, pela condensação da acetilCoA, formam-se os ácidos graxos e acetogeninas.

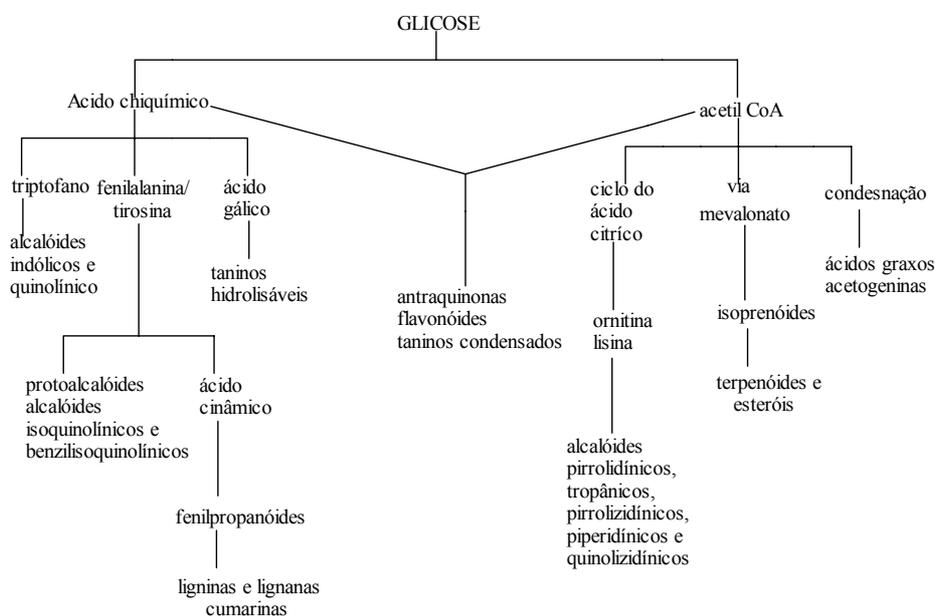


FIGURA 7 - Rota metabólica do metabolismo secundário (Santos, 2004).

A fitoquímica realiza pesquisas nas quais vários metabólitos são isolados e elucidados quanto às suas estruturas moleculares. A partir do século XIX, foram registrados os primeiros compostos isolados de plantas, como a morfina e a quinina, utilizadas no tratamento de certas doenças. Atualmente, grande número de compostos derivados de plantas são utilizados nas formulações de remédios e em sínteses orgânicas, funcionando como protótipos de importantes agentes terapêuticos sintéticos. Dessa forma, várias áreas da ciência têm se interessado em buscar informações úteis para a correta utilização desses compostos, que possuem distribuição e características químicas peculiares (Matos, 1997; Simões & Spitzzer, 2004).

2.2.1 Óleo essencial

Os óleos essenciais são compostos voláteis obtidos por diversas partes de plantas pela destilação por arraste a vapor d'água ou por prensagem de pericarpos de frutos cítricos. São constituídos em sua maioria, de derivados dos fenilpropanóides ou de terpenóides; sendo esses últimos predominantes. Apresentam como uma mistura de diferentes concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos de enxofre. Normalmente, um deles é o composto majoritário, havendo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). São produzidos no metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie, fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta. Dependendo da família, podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Podem ser estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (Simões & Spitzzer, 2004).

São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; poucos são os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor em azulenos; em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades essas usadas na sua identificação e controle da qualidade (Simões & Spitzzer, 2004).

Durante muito tempo, os óleos essenciais foram considerados desperdício fisiológico ou produtos de desintoxicação. Atualmente, desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade, agindo como inibidores

da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (Craveiro, 1981).

O mercado mundial de óleos essenciais vem crescendo constantemente, ou seja, estima-se um aumento de 7,5% entre os anos de 1997 e 2000. Avalia-se a produção brasileira de óleos essenciais em 45 milhões de dólares, o que corresponde a 13,1% da produção mundial. O maior problema da agroindústria produtora de óleos é a concorrência com similares sintéticos. Felizmente, a indústria que mais necessita desse, a alimentícia, tem substituído os produtos sintéticos por naturais, por causa das exigências atuais do mercado (Salgado, 2005).

Lima et al. (2003), avaliando a influência de fatores abióticos na produção de terpenóides, constataram que a baixa intensidade luminosa diminuiu a sua produção e que pequenas variações diárias de temperatura causaram o contrário. Salgado (2005), avaliando três níveis de irradiação de luz (100%, 50% e 30%) sob o rendimento e qualidade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*), concluiu que o maior nível de irradiação causou aumentos em todas as características avaliadas.

Quimicamente, os constituintes dos óleos essenciais pertencem a duas classes químicas distintas: fenilpropanóides e terpenóides. Os fenilpropanóides são caracterizados por apresentarem um anel benzênico com uma cadeia lateral de três carbonos (Figura 8) (Taiz & Zeiger, 2004); e os terpenóides formados pela condensação de duas ou mais unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 9); dessa forma, esses últimos são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem, sendo os mais freqüentes os monoterpenóides (cerca de 90% dos óleos) e os sesquiterpenos (Quadro 1) (Simões & Spitzer, 2004).

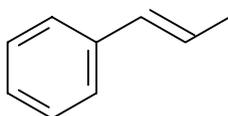


FIGURA 8 - Representação básica de um fenilpropanóide.

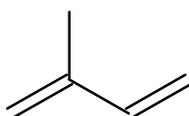


FIGURA 9 - Estrutura química do isopreno.

QUADRO 1 -Condensação de unidades de isopreno na formação de terpenóides.

Nº unid.	Nº átomos de carbono	Classe
1		Isopreno
2		Monoterpenóide
3		Sesquiterpenóides

Os terpenóides são sintetizados via mevalonato, o qual é formado pela condensação aldólica de duas unidades da acetoacetyl-CoA, seguida de uma hidrólise, originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esse sofre uma reação de redução catalizada pela enzima HMGCoA-redutase à

mevalonato. O mevalonato é, então, convertido em isopentil-pirofosfato (IPP) ou isopreno ativo e seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP). As moléculas de IPP e DMAPP condensam e formam o trans-geranil-pirofosfato, dando origem aos monoterpênos e sesquiterpênos (Figura 10) (Santos, 2004).

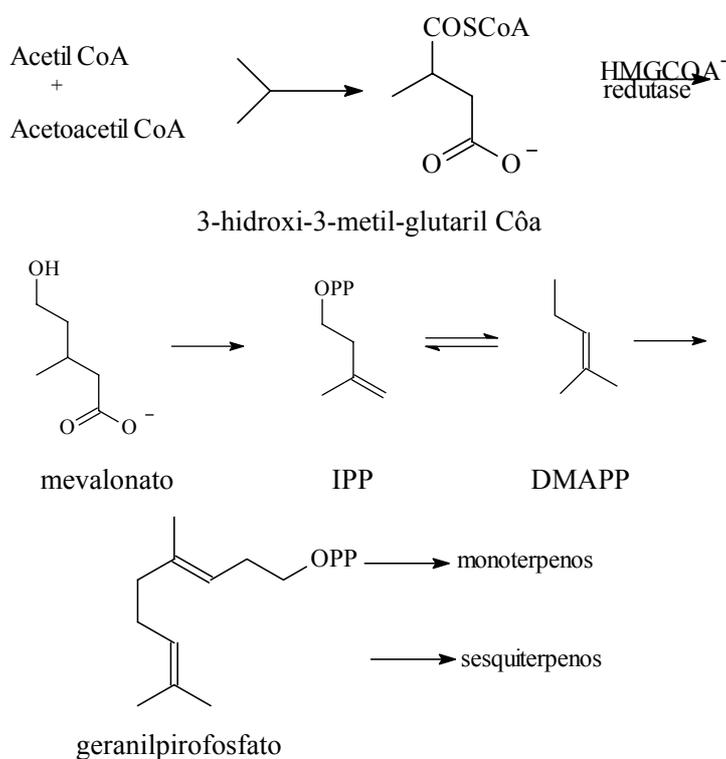


FIGURA 10 - Biosíntese de terpenóides.

Os fenilpropanóides são formados pela rota do ácido chiquímico, dando origem à fenilalanina e à tirosina, que pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico e p-cumárico, repectivamente (Figura 11) (Robbers et al. 1997).

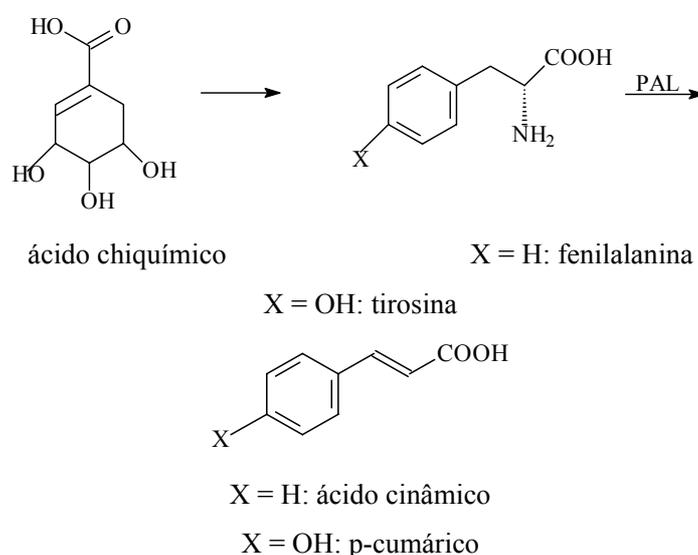


FIGURA 11 - Biossíntese dos fenilpropanóides

Os ácidos cinâmicos são os precursores da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides, compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligados ao anel aromático. Grande parte desses metabólitos são ácidos ou derivados desses. A redução da cadeia lateral conduz à formação de compostos importantes presentes em óleos voláteis, como o eugenol e o anetol. Essa cadeia lateral também pode perder átomos de carbono,

originando derivados com dois ou com um átomo de carbono (Santos et al, 2004).

Outra rota de biossíntese de terpenos é a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (Figura 12). Por essa via, o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato formam o 1-deoxi-D-xilose-5-fosfato (DXPS) que, posteriormente, dá origem ao 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Em seguida, são formados, por sucessivas reações, o isopentenil-difosfato (IPP) e o dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) e, em seguida, dão origem aos terpenos (Guimarães, 2007).

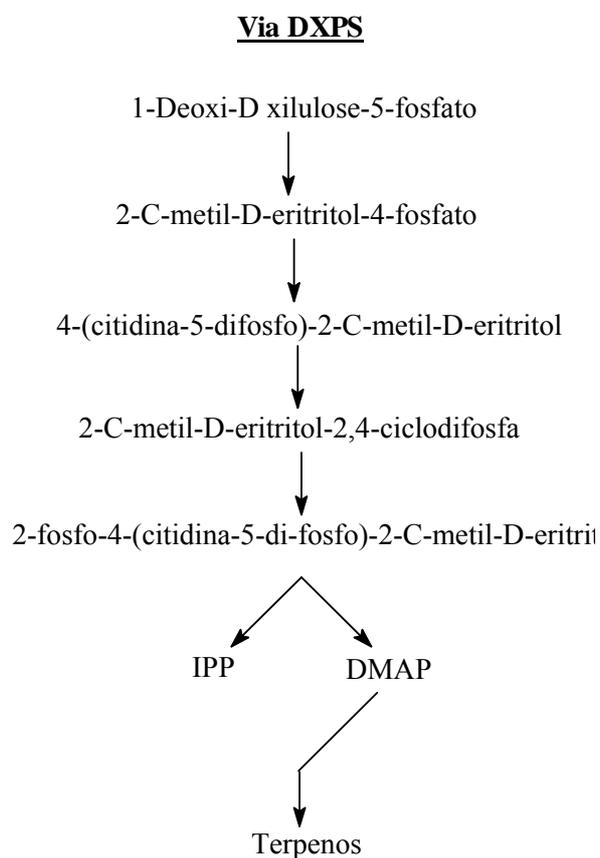


FIGURA 12 - Representação da biossíntese dos terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (Guimarães, 2007).

2.2.1.1 Atividade biológica dos óleos essenciais

Os óleos essenciais presentes nas plantas, ervas e condimentos têm apresentado atividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças alimentares ou deteriorantes de alimentos, sendo esses causadores de diversos prejuízos para as indústrias alimentícias. Recentemente, há um crescente interesse por parte dos consumidores por produtos naturais em decorrência de os antimicrobianos sintéticos apresentarem toxicidade ao consumidor (Kotzekidou et al. 2007).

As concentrações do óleo para inibir o crescimento microbiano devem ser maiores que aquelas utilizadas para realçar o sabor e o aroma dos alimentos. Para Shelef (1983), a concentração para inibir é de 1% a 5%, ao passo que, para fins culinários, utilizam-se de 0,5 a 1%, o que não é suficiente para inibir a atividade microbiana. Portanto, a determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador de sabor e aroma dos alimentos é primordial para a utilização dos óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos.

Em vários trabalhos, têm sido relatado a atividade biológica dos óleos essenciais; porém, há poucos estudos que se relaciona o mecanismo de ação desses produtos na célula microbiana. Trabalhos de Conner & Beuchat (1984) mostraram que os óleos essenciais danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive os envolvidos na produção de energia celular e na síntese de compostos estruturais, interfundo no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular.

Barbel & Yashphe (1989), avaliando o efeito do óleo essencial de *Achillea fragmentissima* com a *Escherichia coli*, concluíram que o óleo atua na membrana bacteriana, inibindo a respiração celular, reduzindo o conteúdo de ATP, além de facilitarem a liberação de polipeptídeos e íons K⁺ para o meio.

Ozturk et al. (2007), estudando a composição química e a atividade bacteriana do óleo essencial de uma planta típica da Turquia, *Zizphora clinopodioides*, observaram que esse era responsável pela formação do halo de inibição contra *Bacillus flexus*, *Bacillus sphaericus*, *Enterobacter sakazakii* e *Moraxella catarrhalis*. Segundo esses pesquisadores, os compostos pulegone e 1,8-cineol presentes no óleo essencial (Figura 13) foram os responsáveis por esse processo biológico.

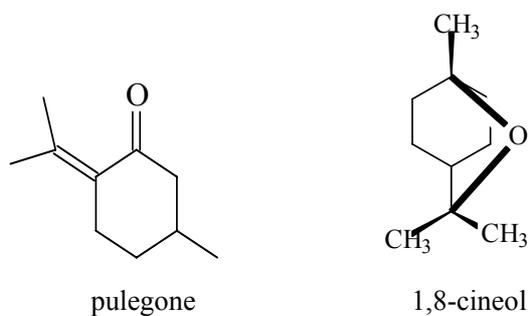


FIGURA 13 - Estrutura química do pulegone e 1,8-cineol.

O óleo essencial das folhas frescas de cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) foi avaliado frente ao fungo *Aspergillus flavus* por Pimentel, (2007). Constatou-se que a inibição total do crescimento micelial ocorreu na concentração de 0,5 μ L/mL, atribuindo essa atividade à presença de benzaldeído, álcool benzílico e benzoato de benzila (Figura 14), constituintes majoritários presentes no seu óleo essencial.

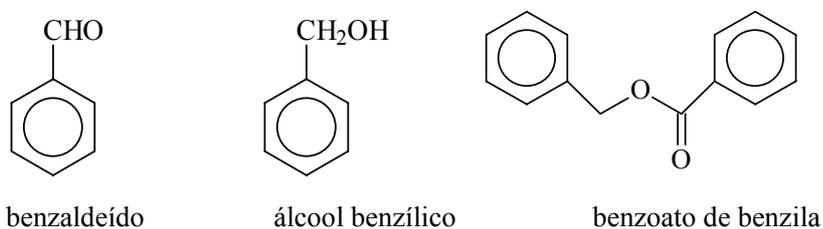


FIGURA 14 - Estrutura química do benzaldeído, álcool benzílico e benzoato de benzila.

Avaliando o efeito antibacteriano de 28 óleos essenciais sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytognes*, Oussalah et al. (2007) encontraram resultado positivo para os óleos essenciais de *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomun cássia*, *Origanum heracleoticum*, *Satureja montana* e *Cinnamomum verum*. Essa atividade foi atribuída ao carvacrol (composto majoritário dos óleos essenciais de *Corydothymus capitatus* e *Origanum heracleoticum*), aldeído cinâmico, (composto majoritário do óleo de *Cinnamomun cássia* e *Cinnamomum verum*) e ao timol presente no óleo de *Satureja Montana* (Figura 15).

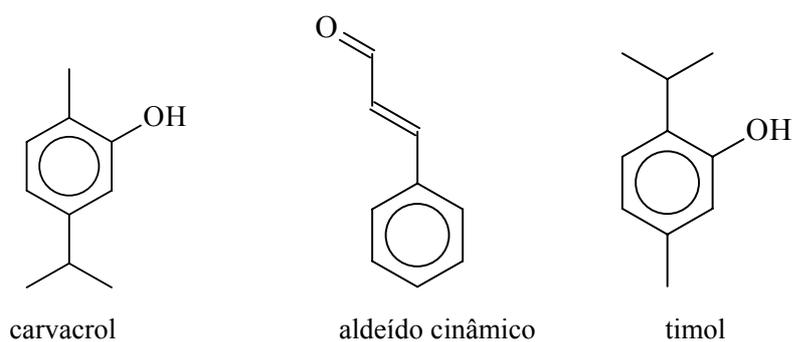


FIGURA 15 - Estrutura química do carvacrol, aldeído cinâmico e timol.

Pereira (2006) comprovou o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e concluiu que o efeito foi devido à presença dos compostos majoritários citral, terpen-4-ol e eugenol (Figura 16) encontrados nesses óleos, respectivamente.

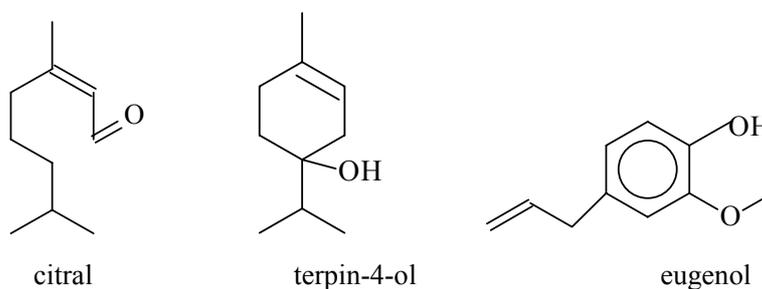


FIGURA 16 - Estruturas química citral, terpen-4-ol e eugenol.

Pereira et al. (2006) comprovaram a atividade antifúngica do óleo essencial de cinco plantas condimentares: *Rosmarium officinales* (alecrim), *Allium cepa* (cebola), *Ocimum basilum* (manjeriço), *Mentha piprita* (menta) e *Origanum vulgare* (orégano). Esses foram estudados sobre os fungos do gênero *Fusarium sp* e *Aspergillus sp*, apresentando como concentração inibitória de 1500 µg/mL.

Oussalah et al. (2006) avaliaram a atividade bacteriana de óleos essenciais de plantas que contem eugenol, timol, carvacrol, linalol e neral (Figura 17) nas concentrações 0,003, 0,006, 0,013, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4% sobre o crescimento de *E.coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Spaphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Os autores observaram que

todos apresentaram alguma influência sobre o crescimento das bactérias nas variadas concentrações; portanto, a contaminação de alimentos, apesar de ser um problema considerável para a saúde pública, pode ser controlada utilizando-se conservantes naturais.

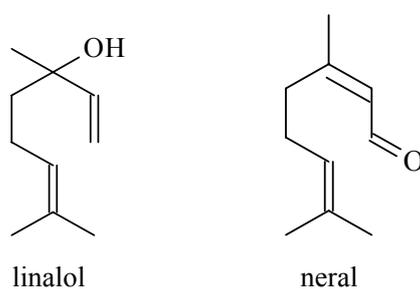


FIGURA 17 - Estruturas químicas linalol e neral.

2.3 Microorganismos em alimentos

Os alimentos, quando não manipulados de forma adequada, são capazes de transmitir diversos microrganismos, muitas vezes patógenos para os homens, como as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ou também deteriorantes, como várias espécies de fungos (*Aspergillus sp*, *Fusarium sp*) causando diversos prejuízos para as indústrias alimentícias.

Por possuírem um papel importante na economia mundial, os alimentos devem ser elaborados a partir de padrões sanitários que apresentem boa qualidade e segurança física, química e biológica. No caso das toxinfecções alimentares, o enfoque ocorre na contaminação bacteriana, uma vez que essa é a maior causa desse tipo de enfermidade (Pereira, 2006).

Alimentos deteriorados são aqueles que têm sabor e odor desagradáveis. Essa deteriorização é resultado do crescimento indesejável de microrganismos produtores de compostos voláteis durante o seu metabolismo, os quais o olfato e o paladar humano podem detectar (Forsythe, 2005).

2.3.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram-positiva com cerca de 1 µm de diâmetro, a qual ocorre em pares, em pequenas cadeias ou em cachos similares aos de uva, pertencente à família *Micrococcaceae*. É uma bactéria anaeróbica facultativa, catalase-positiva e oxidase-positiva e é dividida em diversos biótipos, tendo como bases testes bioquímicos e padrões de resistência (Adams, 2000; Forsythe, 2005).

Essa espécie produz uma grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência: estafiloquinase, hialuronidase, fosfatase, coagulase e hemolisinas. As intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas, proteínas de baixo peso molecular. Essas toxinas são termoestáveis e resistentes à cocção ou enzimas proteolíticas. Uma dose menor que 1,0 µg/Kg, produzida por 10⁵ microrganismos por grama em alimentos contaminados, produzirá sintomas de contaminação por estafilococos (Forsythe, 2005).

O *Staphylococcus aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não-formadoras de esporos. A temperatura de multiplicação está entre 7 e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento. Suas enterotoxinas são produzidas quando cultivadas a temperaturas entre 10-48°C; contudo, a faixa de 35°- 40°C é considerada a ótima para sua produção. A faixa de pH ótima para o seu crescimento é de 6 – 7, sendo 4 e 10 seus limites mínimos e máximos, respectivamente. Para a suas enterotoxinas, o pH é na faixa de 6 (Adams, 2000).

Os estafilococos existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos ou equipamentos de processamento de alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais. Os homens e animais são os reservatórios principais, presentes nas vias nasais, na garganta, cabelo e pele. As intoxicações são causadas pela ingestão das enterotoxinas presentes nos alimentos (carne, frangos, ovos, saladas, produtos de panificação, leite ou produtos lácteos) quando esses não foram mantidos quente (60°C ou mais) ou frio (7,2°C ou menos) (Forsythe, 2005).

Os sintomas são caracterizados por períodos curtos de incubação, tipicamente 2 – 4 horas. Náuseas, vômitos, dores abdominais e prostração são os sintomas predominantes, embora a diarreia é frequentemente notificada, a recuperação ocorre 1 a 2 dias. Esses sintomas podem variar dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido, da quantidade de toxina presente no alimento e da saúde da pessoa (Santos A., 2004).

2.3.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, não-esporulado anaeróbico facultativo, catalase-negativo, oxidase-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que é capaz de fermentar a glicose, com produção de ácido e gás. Pode ser móvel, dotado de flagelos peritríquicos ou imóveis. É um gênero com grande número de linhagens e pode ser encarado como possuidor de uma única espécie, na qual existem várias centenas de diferentes tipos antigênicos (Holt et al., 1994; Franco & Landgraf 1998; Adams, 2000).

Esse bacilo apresenta antígenos somáticos O, relacionados com polissacarídeo de membrana; antígenos flagelares H, relacionados com as proteínas flagelares e, ainda, antígenos K, relacionados com os polissacarídeos

capsulares. Foram descritos 173 antígenos O, 56 H e 100K (Franco& Landgraf, 1998).

Fazem parte da flora de animais de sangue quente. Sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal; porém, não é normalmente considerada patogênica; entretanto, pode ser a responsável por infecções urinárias e produtora de enterotoxinas, que podem causar graves doenças de origem alimentar (Tortora, 2000).

Seus sintomas são caracterizados por diarreia acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre com duração de seis horas a três dias, com período de incubação que varia entre 17 e 72 horas (Franco& Landgraf, 1998)

A *Escherichia coli* possui sua temperatura de desenvolvimento entre 10 - 50°C sendo 37°C sua temperatura ótima e seu pH abaixo de 4,4 (Adams, 2000).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas, as linhagens de *Escherichia coli* consideradas patogênicas são agrupadas em cinco classes: EPEC (enteropatogênia clássica); EIEC (enteroinvasora); ETEC (enterotoxigênica); EHEC (entero-hemorrágica) e EAaggEC (enteroagrativa) (Franco & Landgraf, 1998).

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

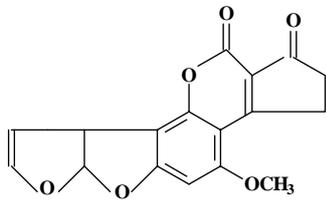
2.3.3 *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são de grande importância para as autoridades governamentais, devido a sua característica de

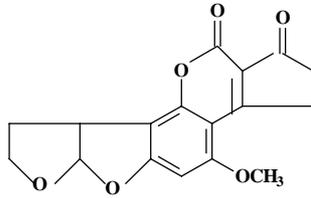
produtores de micotoxinas, produtos tóxicos que se desenvolvem sobre ou em produtos alimentícios de origem animal ou vegetal.

Entre as micotoxinas, tem sido dada maior atenção às aflatoxinas produzidas por certas linhagens dos fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*: essas variam em estruturas de anéis heterocíclicos simples até estruturas com 6 ou 8 membros anelares. As aflatoxinas de maior interesse são caracterizadas como B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 18) pela fluorescência de cor azul (B) ou verde (G), que ocorre quando visualizadas sob luz ultravioleta. A aflatoxina B₁ é comumente encontrada e é a mais tóxica, durante o seu metabolismo em animais, produz a aflatoxina M, que é excretada no leite e urina de vacas leiteiras (Forsythe, 2005).

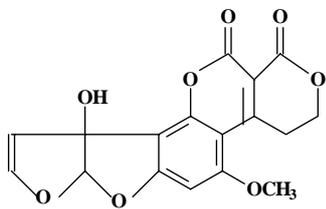
As aflatoxinas são encontradas em rações e certos alimentos, como amendoim, milho, semente de algodão, centeio, sorgo, trigo, cevada, nozes, castanha-do-brasil, etc Produzem necrose aguda, cirrose e carcinoma no fígado em diversas espécies animais. Para a maioria das espécies, o valor de LD₅₀ varia de 0,5 a 10 mg/Kg de peso corporal. A toxicidade pode ser influenciada por fatores ambientais, nível de exposição e duração à exposição, idade, saúde e estado nutricional. A aflatoxina B₁ é um composto carcinogênico muito potente em várias espécies (Scussel, 1998; Forsythe, 2005).



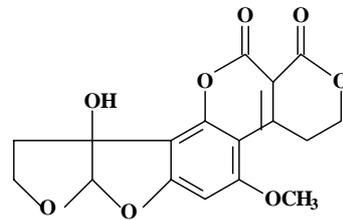
B₁



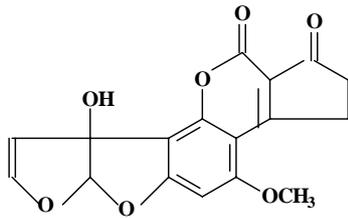
B₂



G₁



G₂



M₁

FIGURA18 - Estruturas químicas das aflatoxinas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Óleo essencial

3.1.1 Material vegetal

Os materiais vegetais, *Illicium verum* (210 g); *Origanum manjorona* (186 g) e *Cinnamomum zeylanicum* (156 g) foram adquiridos de forma seca no comércio da cidade de Lavras/MG.

3.1.2 Extração do óleo essencial

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Química Orgânica de Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras - MG. O método empregado foi o de arraste a vapor d'água, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 6 litros (Castro et al., 2006). As folhas de manjerona, as cascas de canela e as sementes de anis-estrelado foram utilizados da mesma forma que adquiridos. A extração foi realizada durante 2 horas, mantendo a solução em ebulição. Posteriormente, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x G por 5 minutos. O óleo foi coletado com o auxílio de uma micropipeta, pesado e colocado em um frasco de vidro com tampa envolto com papel alumínio e guardado em geladeira ou sob refrigeração.

3.1.3 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade, foram utilizados 5 gramas de cada matéria-prima, emergidas em 80 mL de cicloexano e colocadas em um balão com capacidade de 250 mL, acoplado a um condensador, com coletor

volumetricamente graduado. O aquecimento foi realizado por meio da manta aquecedora. Após o processo de destilação, com duração de 2 horas de realização, quantificou-se o volume de água presente nas matérias-primas. A umidade foi calculada medindo-se o teor de água contido em 100 gramas de amostra (Pimentel et al., 2006).

3.1.4 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

As análises qualitativas dos óleos foram realizadas no Laboratório de Análises e Sínteses de Agroquímicos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Viçosa – MG, por meio de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM). Utilizou-se um aparelho Shimadzu CG-17^a, com detector seletivo de massa modelo QP 5000 sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura de filme); temperatura do injetor de 220°C; programação da coluna com temperatura inicial de 40°C, sendo acrescidos 3°C a cada minuto até atingir 240°C; gás carreador hélio (1 mL min⁻¹); taxa de split 1:10; volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão inicial na coluna de 100,2 KPa. As condições de EM foram: energia de impacto de 70 eV; velocidade de decomposição 1000; intervalo de decomposição de 0,50; e fragmentos de 45 Da e 450 Da decompostos. Injetou-se, nas mesmas condições das amostras, uma série de padrões de hidrocarbonetos (C₉H₂₀ C₂₆H₅₄). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovat's, calculado para cada constituinte, de acordo com Adams (1995).

As análises quantitativas foram conduzidas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) – Lavras – MG. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas condições

operacionais: coluna capilar DB5; temperatura do injetor de 220°C; temperatura de detector DIC de 240°C; programação da coluna com temperatura inicial de 40°C até 240°C; gás carreador nitrogênio (2,2 mL min⁻¹); taxa de split 1:10 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

3.2 Atividade Microbiana dos Óleos Essenciais

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

3.2.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25992, cedidas pelo Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras – Lavras/MG.

A cepa de *Aspergillus flavus*, isoladas da castanha-do-brasil, foram fornecidas pela Embrapa/Acre.

A cepa de *Aspergillus parasiticus* de cereais, pelo Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras – Lavras/MG.

3.2.2 Manutenção das culturas e padronização

3.2.2.1 Bactérias

Os microrganismos foram mantidos sob refrigeração (4°C) e repicados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), ficando incubados a 37°C por 24 horas para a ativação das culturas. A seguir, foram realizados plaqueamentos das culturas *E. coli* e *S. aureus* para os meios seletivos ágar Eosina de Azul de

Metileno (EMB) e Plate Count Agar (PCA), respectivamente. Selecionaram-se três colônias do mesmo tipo morfológico, que foram transferidas para 5 mL de caldo de soja triptica (TSA). Incubaram-se os tubos a 37°C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5, resultando em uma suspensão de 10⁸ UFC/mL (National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS, 2003).

3.2.2.2 Fungos

As cepas dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* foram mantidas em meio inclinado CZAPEK-DOS (CYA), acrescentado de extrato de levedura em BOD a 25°C. Com o auxílio de uma alça, essas foram repicadas em placas de Petri contendo 20 mL do mesmo meio de cultura, para a sua ativação e verificação de contaminação. Incubaram-se as placas a 25°C por 7 dias.

3.2.3 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *E. coli* e *S. aureus*.

Para a avaliação “*in vitro*” do efeito inibitório dos óleos de *Illicium verum* (anis-estrelado), *Origanum manjorana* (manjerona) e *Cinnamomum zeylanicum* (canela), foram utilizadas as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25992. Uma alíquota de 5 mL do caldo TSA contendo 10⁸ UFC/mL foi transferida para o meio de cultura Mueller Hinton, cuja metodologia empregada foi a difusão em ágar. Os slots ou poços de deposição dos óleos essenciais foram feitos no ágar com o auxílio de pérolas de vidro, retiradas previamente. Em seguida, 10 µL dos óleos essenciais diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) foram transferidos para os slots.

O ágar Miller Hinton foi incubado com as culturas reveladoras (*S. aureus* e *E. coli*) e depositados sobre camada do mesmo ágar em que foram feitos os slots. Esses foram preenchidos com os óleos nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30; 40 e 50%. Para a análise do sinergismo (combinação entre

os óleos), foram utilizadas as concentrações 0,1; 1; 5; 10 e 30%. As placas foram incubadas em BOD 37°C por 24 horas e medidos os diâmetros dos halos formados (Ogunwande et al, 2005). Foi realizada uma testemunha com a aplicação de 10 µL da testemunha (DMSO).

Os experimentos foram conduzidos no delineamento em blocos casualizados, com duas repetições, sendo o fator bactérias o bloco. As variáveis relativas à formação do halo de crescimento foram submetidas à análise de variância, e as comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukel (5%), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

3.2.4 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *A. flavus* e *A. parasiticus*

Inicialmente foram realizados testes preliminares com os óleos essenciais para estabelecer intervalos de quantidades capazes de provocarem inibição dos fungos.

O método realizado foi o bioanalítico “*in vitro*”, por meio do qual avaliaram-se as propriedades fungicidas dos óleos essenciais de anis-estrelado e manjerona foram testadas sobre o crescimento e/ou inibição micelial de *Aspergillus flavus* nas concentrações de 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 µL/mL. O óleo essencial de canela foi testado nas concentrações de 0; 0,005; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,08 µL/mL, pois, com testes preliminares, observou-se que concentrações superiores eram letais ao *A. flavus*, não determinando, dessa forma, a CMI. O efeito sinérgico dos óleos de anis-estrelado e manjerona foi realizado na concentração de 0,1 µg/mL para o *A. flavus*. Para o *A. parasiticus*, foram utilizadas as concentrações 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 µL/mL. Já para a combinação dois a dois dos óleos de manjerona, anis-estrelado e canela frente ao *Aspergillus parasiticus* utilizou a concentração de 0,1 µL/mL. Observaram-se o crescimento e/ou inibição micelial da cultura fúngica, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo).

Em uma capela asséptica de fluxo laminar, foram adicionados ao meio de cultura, a uma temperatura de aproximadamente 45°C, os óleos essenciais diluídos em DMSO. As placas de Petri foram previamente marcadas e esterilizadas, estabelecendo um padrão de 20 mL do meio para cada uma. O meio de cultura foi vertido e, em seguida, no centro dessas placas, foram inoculados os fungos. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD à temperatura de 25°C durante 7 dias. A testemunha relativa (DMSO) foi incorporada na dosagem de 2,5 µg/mL de substrato (Wang et al., 2005).

As avaliações foram realizadas após 7 dias da montagem do experimento, por meio de medições diametralmente opostas do crescimento micelial e, de cada duas medidas opostas, foram calculadas as médias.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. As variáveis relativas à formação do halo de crescimento foram submetidas à análise de variância e as comparações múltiplas de médias pelo teste de Scott-Knott (5%), utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Óleos Essenciais

4.1.1 Rendimento

Os teores dos óleos essenciais das espécies estudadas estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Rendimento dos óleos essenciais de *Origanum manjorona*, *Illicium verum* e *Cinnamomum zeylanicum*.

Planta	Massa (g)	Teor (%)	Umidade (%)
<i>Origanum manjorona</i> (manjerona)	62	0,0623	7
<i>Illicium verum</i> (anis-estrelado)	70	2,80	10
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	156	0,70	7

Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que o rendimento dos óleos essenciais foi de 0,0623% com as folhas secas de manjerona, 2,8% para os frutos secos de anis-estrelado e 0,7%, para as cascas secas de canela. Vera & CHANE-MING (1999), pesquisando o óleo essencial de manjerona, obteve um rendimento de 1%, valor bem maior do que aquele encontrado neste estudo. Koketsu et al., (1997) encontraram um rendimento de 0,27 % para o óleo essencial de casca de canela, inferior ao encontrado, que foi de 0,7% com 7% de umidade. Não foram encontrados na literatura dados do rendimento de anis-estrelado. Segundo Burt (2004), essas variações podem ser atribuídas a

diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar no dia da colheita.

4.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

4.1.2.1 *Origanum manjorona*

Na Tabela 2, pode-se observar que foram identificados dez constituintes pertencentes às classes dos monoterpenóides e sesquiterpenóides no óleo essencial extraído das folhas secas de manjerona, tendo como compostos majoritários os monoterpenóides 4-terpineol e γ -terpineno nas concentrações de 34,23% e 14,28%, respectivamente.

TABELA 2 - Composição química do óleo essencial de folhas seca de manjerona.

Pico	Composto	TR	IKcal	IKtab	Concentração média (%)
1	Sabineno	10,199	974	976	5,29
2	α -terpineno	12,158	1015	1018	8,17
3	p-cimeno	12,488	1024	1026	3,47
4	Limoneno	12,694	1029	1031	3,11
5	γ -terpineno	14,200	1061	1062	14,28
6	Hidrato de cis-sabineno	14,539	1068	1068	3,02
8	Hidrato de trans-sabineno	16,091	1097	1097	8,81
9	4-terpineol	20,078	1175	1177	34,23
10	α -terpineol	20,608	1188	1189	5,30
11	Trans-cariofileno	31,194	1416	1418	2,68
Total Identificado					88,36

O cromatograma do seu óleo essencial apresentou 12 picos (Figura 19). Entre os componentes identificados, estão o 4-terpineol (Figura 20) como composto majoritário com 34,23% seguido do γ -terpineno, hidrato de trans-sabineno, α -terpineno e α -terpineol, nas concentrações de 14,28%; 8,81%; 8,17% e 5,3% respectivamente.

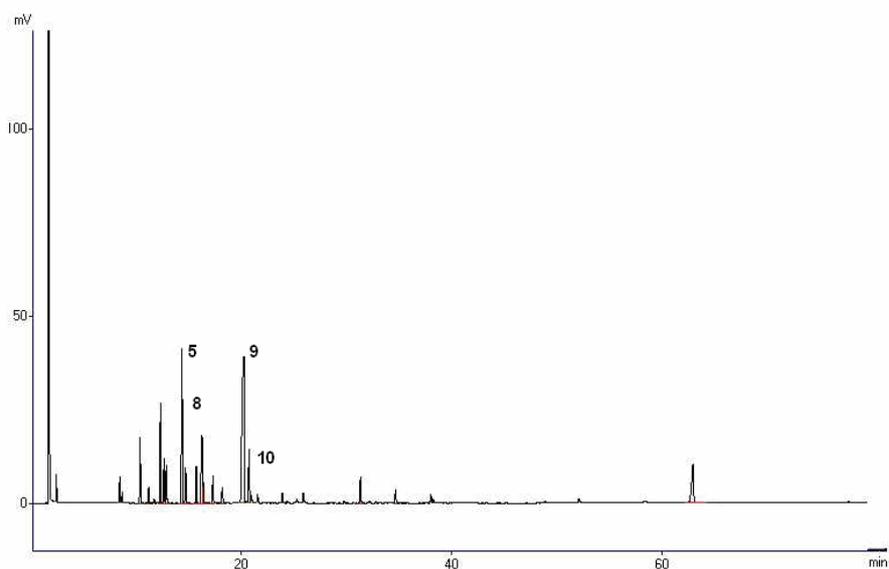


FIGURA 19 - Cromatograma do óleo essencial de folhas secas de manjerona: 5: γ -terpineol; 8: hidrato de trans-sabineno; 9: 4-terpineol; 10: α -terpineol

Vera & Chane-ming (1999), avaliando a composição química do óleo essencial de manjerona, identificaram o 4-terpineol, γ -terpineno, hidrato de trans-sabineno, entre outros, presentes no óleo estudado. Encontraram o cis-sabineno (14,95%), composto não identificado no óleo em estudo. Vagi et al.

(2005), realizando o mesmo trabalho de caracterização, identificaram os compostos 4-terpineol (30,3%) e γ -terpineno (14,0%) como majoritários.

Omidbeygi et al. (2007), caracterizaram γ -terpineno (Figura 20) na concentração de 20,72%, como componente majoritário.

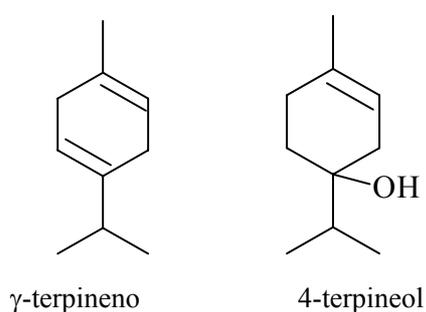


FIGURA 20 - Estrutura química do γ -terpineno e 4-terpineol.

4.1.2.2 *Illicium verum*

O óleo essencial de *Illicium verum* apresentou seis substâncias principais caracterizadas por CG-EM (Tabela 3). Analisando os dados, foram identificados oito picos (Figura 21). Entre os compostos identificados, consideram-se como majoritários o trans-anetol, limoneno e metilchavicol, nas concentrações de 90,413%; 2,652% e 1,261%, respectivamente (Figura 22).

TABELA 3 - Composição química do óleo essencial de anis-estrelado.

Pico	Composto	TR	IKcal	IKtab	Concentração média (%)
1	α -pineno	8,444	933	939	0,349
2	Limoneno	13,024	1034	1031	2,652
3	Linalol	17,041	1115	1098	1,070
4	4-terpineol	20,337	1183	1177	0,295
6	Metil chavicol	21,843	1193	1195	1,261
7	(E)-anetol	25,691	1280	1283	90,413
Total identificado					96,04

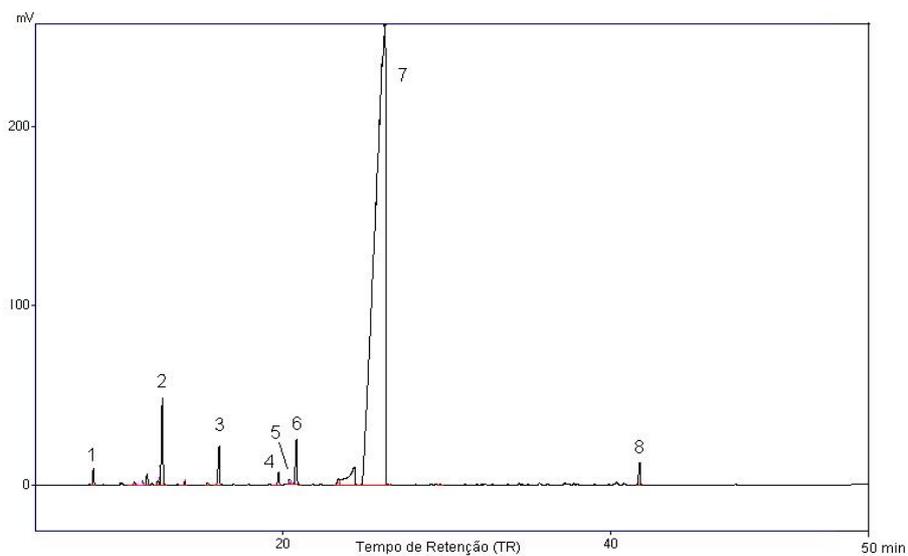


FIGURA 21 - Cromatograma do óleo essencial de anis-estrelado. 1: α -pineno; 2: limoneno; 3: Linalol; 4: 4-terpineol; 6: metil chavicol; 7: trans anetol

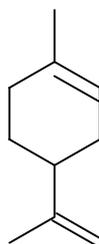


FIGURA 22 - Estrutura química do limoneno.

Gulçin et al. (2003) encontraram o trans-anetol como composto majoritário no óleo essencial das sementes de *Pimpinella anisum* (Umbellifera). Tabanca et al. (2006), realizando o mesmo trabalho de caracterização química, encontraram o trans-anetol como constituinte majoritário. Esses resultados foram similares aos encontrados na planta estudada.

Santos et al. (2004) mostraram que, de acordo com o período de secagem e a estação do ano da *Lippia alba*, ocorria variação na concentração do limoneno; sendo a estação seca, com seis dias de secagem, a que apresentou o maior teor desse composto. Para o limoneno, falta de uniformidade do teor do composto majoritário reflete o dinamismo das interconversões que ocorrem continuamente entre os constituintes do óleo essencial.

4.1.2.3 *Cinnamomum zeylanicum*

Por meio da análise cromatográfica CG/EM, foi possível identificar três constituintes (Tabela 4) no óleo essencial de cascas secas de canela. O composto majoritário foi o aldeído cinâmico na concentração de 87,7%, seguido de β -pineno (4,23%) e α -pineno (7,98%).

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

Pico	Composto	IKcal	IKtab	Concentração média (%)
1	α - pineno	938	939	7,98
2	β - pineno	979	980	4,23
3	Aldeído cinâmico	1260	1263	87,70
Total identificado				99,91

O cromatograma do óleo essencial da casca seca da canela apresentou três picos (Figura 23). Esses picos correspondem ao composto majoritário: o aldeído cinâmico (87,70%), seguido do β - pineno (4,23%) e α - pineno(7,98%) .

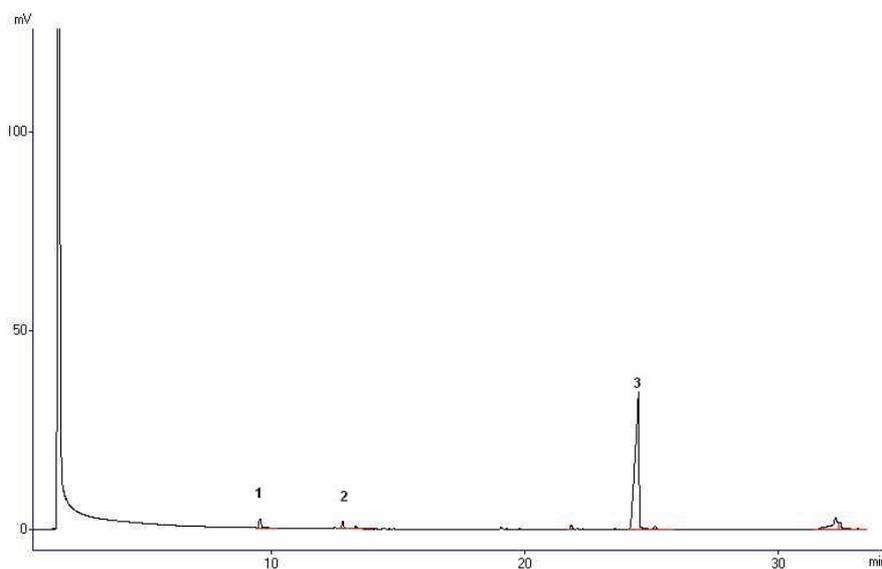


FIGURA 23 - Cromatograma do óleo essencial de canela: 1: α -pineno; 2: β -pineno; 3: aldeído cinâmico.

Sharverdh et al. (2007), avaliando a atividade biológica do óleo essencial de canela, encontraram em sua constituição como composto majoritário o aldeído cinâmico (64,17%), resultado inferior ao encontrado com a planta em estudo.

Em vários trabalhos, constata-se a utilização do aldeído cinâmico (Figura 24), um fenilpropanóide, de larga atividade biológica bactérias, fungos e leveduras, sendo muito utilizado como antisséptico (Fichi et al., 2007; Senhaji et al., 2007; Sharverdh et al., 2007).

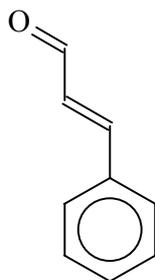


FIGURA 24 - Estrutura química do aldeído cinâmico.

Koketsu et al. (1997) avaliaram o teor dos compostos majoritários das folhas e cascas de canela com dois tipos de adubação. Observaram que o aldeído cinâmico, presente no óleo essencial da planta tratada com adubo químico, estava presente em maior teor (58,4%) no óleo essencial extraído da casca. O eugenol foi considerado o composto majoritário encontrado no óleo essencial das folhas de canela, sendo sua concentração de 95,1% na planta submetida à adubação química. O eugenol foi identificado no óleo essencial da casca (14,85%), porém não identificado no óleo de canela estudado.

4.2 Atividade biológica

4.2.1 Efeito inibitório de óleos essenciais sobre *A. flavus* e *A. parasiticus*

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11, observa-se que os óleos essenciais testados apresentaram inibição do desenvolvimento micelial dos fungos estudados, quando comparados com a testemunha não tratada.

Verifica-se, pelos dados da Tabela 5, que o *A. flavus* teve seu desenvolvimento micelial afetado pelo óleo essencial de anis-estrelado a partir de 0,1 µL/mL, com um crescimento médio de 5,8 cm, enquanto a testemunha apresentou 7,6 cm, a uma concentração mínima inibitória (CMI) de 1 µL/mL.

Pelos resultados referentes à adição do óleo essencial de manjerona (Tabela 5), verifica-se que em relação ao *A. flavus*, ocorreu uma tendência de aumento nos índices de inibição do desenvolvimento micelial proporcional ao aumento das concentrações testadas, não sendo possível determinar a sua CMI. Foram reveladas diferenças significativas entre todas as concentrações analisadas.

TABELA 5 - Valores médios do diâmetro do crescimento micelial de *A. flavus* em função da concentração.

Concentração (µl/mL)	Formação do halo de inibição (cm)	
	Manjerona	Anis
0	7,64 f	7,64 b
0,1	5,1 e	5,68 b
0,25	3,19 d	2,49 a
0,5	2,36 c	0,95 a
1	1,86 b	0 a
2	0,9 a	0 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Com relação ao tratamento de adição de óleo essencial de canela ao meio de cultura com *A. flavus* (Tabela 6), observa-se que seu desenvolvimento foi afetado a partir da concentração de 0,005 $\mu\text{L}/\text{mL}$; porém, com esse tratamento, não se determinou a sua CMI. A concentração de 0,005 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentou diferença significativa em relação às demais concentrações.

TABELA 6 - Valores médios do diâmetro do crescimento micelial de *A. flavus* em função da concentração.

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Formação do halo de inibição (cm)
	Canela
0	7,64 c
0,005	3,99 b
0,01	3,38 a
0,02	3,33 a
0,04	3,01 a
0,08	2,91 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Verifica-se, pelos dados da Tabela 7, que a concentração de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ foi suficiente para inibir o crescimento do *A. parasiticus*. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas.

O óleo essencial de anis-estrelado apresentou uma inibição sobre o *A. parasiticus* a partir da concentração de 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$, em relação à testemunha e uma CMI de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Pode-se observar que o óleo essencial de canela apresentou uma inibição total (100%) do desenvolvimento micelial do fungo testado, a partir da concentração de 0,25 $\mu\text{L/mL}$, confirmando dados anteriores sobre a eficácia desse condimento, quando adicionado sob a forma de pó e óleo essencial aos alimentos (Patkar et al., 1993; Sinhá et al., 1993; Souza et al., 2004).

TABELA 7 - Valores médios do diâmetro do crescimento micelial de *A. parasiticus* em função da concentração.

Concentração ($\mu\text{l/mL}$)	Formação do halo de inibição (cm)		
	Manjerona	Anis-estrelado	Canela
0	7,98 f	7,98 f	7,98
0,1	6,28 e	6,31 e	5,61
0,25	2,06 d	2,44 d	0
0,5	1,45 c	1,98 c	0
1	0,45 b	1,03 b	0
2	0 a	0 a	0

Médias seguidas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974)

Os óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado apresentaram a mesma concentração mínima inibitória de 2 $\mu\text{l/mL}$. Para o óleo essencial de canela, a sua CMI foi de 0,25 $\mu\text{l/mL}$.

Com relação ao óleo essencial de manjerona, observa-se pelos dados da Tabela 8 que o *A. parasiticus* foi mais sensível ao efeito do óleo essencial, pois sua CMI foi de 2 $\mu\text{l/mL}$, ao passo que para o *A. flavus*, não se pôde determinar a

CMI. Em relação às demais concentrações, houve diferença significativa entre os fungos, sendo o *A. flavus* mais resistente.

TABELA 8 - Valores médios do efeito do óleo essencial de manjerona entre *A. parasiticus* e *A. flavus*.

Concentração ($\mu\text{l/mL}$)	Formação do halo de inibição (cm)	
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
0	7,98 a	7,64 b
0,1	6,28 a	5,1 b
0,25	2,06 a	3,18 b
0,5	1,45 a	2,36 b
1	0,45 a	1,87 b
2	0 a	0,9 b

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Em relação à adição do óleo de anis-estrelado, observa-se pelos dados da Tabela 9 que o *A. parasiticus* (CMI 2 $\mu\text{L/mL}$) mostrou-se mais resistente, quando comparado ao *A. flavus* (CMI 1 $\mu\text{L/mL}$). Houve diferença significativa entre os fungos analisados nos diversos tratamentos.

TABELA 9 -Valores médios do efeito do óleo essencial de anis-estrelado entre *A. parasiticus* e *A. flavus*.

Concentração ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	Formação do halo de inibição (cm)	
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
0	7,98 b	7,64 a
0,1	6,31 b	5,63 a
0,25	2,44 a	2,49 a
0,5	1,98 b	0,95 a
1	1,03 b	0 a
2	0 a	0 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Singh et al. (2006) avaliando a atividade antifúngica do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* (erva-doce), tendo o trans-anetol (70,1%) como composto majoritário, observou uma inibição do crescimento micelial de 87,5% sobre o *A. flavus*, em uma concentração de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

A concepção de sinergismo tem sido o tema central de muitas discussões em fitoquímica. A interação entre óleos essenciais pode representar uma alternativa para potencialidade de suas ações, porém, muito ainda precisa ser esclarecido. Harris et al (2002) examinaram a combinação efetiva entre óleos de Melaleuca (*Melaleuca alternifolia* e *Melaleuca quinquenervia*) e a fração polar de Manuka (*Leptospermum scoparium*). Observaram um efeito superior àquele observado individualmente. Para o teste do sinergismo (Tabela 10) entre os óleos de manjerona e anis-estrelado, observa-se que houve diferença

significativa entre o tratamento de 20 % de anis-estrelado e 80% de manjerona com os demais tratamentos.

TABELA 10 - Valores médios do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado sobre o fungo *A. flavus*.

Proporção (%) Anis-estrelado/manjerona	Formação do halo de inibição (cm)
80/20	5,2 b
60/40	5,2 b
40/60	5,38 b
20/80	5,54 a
0/0	7,46 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

Os dados do efeito sinérgico entre os óleos de anis-estrelado, manjerona e canela estão representados na Tabela 11. Observa-se que não houve variação significativa entre a combinação e o comportamento individual dos óleos, constatando-se que não ocorreu sinérgismo entre eles na proporção estudada.

TABELA 11 - Valores médios do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre o fungo *A. parasiticus*.

Porporções (%)	<u>Formação do halo de inibição (cm)</u>		
	Anis/manjerona	Anis/canela	Canela/Manjerona
80/20	3,83 b	3,11 a	3,4 a
60/40	3,5 a	3,55 a	3,25 a
40/60	3,4 a	4,95 a	3,19 a
20/80	3,24 a	2,79 a	3,18 a
0/0	8,48 c	8,48 b	8,48 b

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott (1974).

4.2.2 Atividade bactericida dos óleos essenciais sobre *E. coli* e *S. aureus*.

Os halos de inibição das bactérias *E. coli* e *S. aureus* induzidos pelos óleos essenciais estudados foram medidos e a maioria revelou efeito inibitório.

Com o óleo essencial de anis-estrelado sobre *S. aureus*, verificou-se uma resistência dessa bactéria, ou seja, não ocorreu formação do halo na placa o que também verificado na placa-controle (Tabela 12).

Pelos dados da Tabela 12, pode-se observar que o óleo essencial de canela não promoveu a inibição do crescimento nas concentrações: 0,1; 0,5 e 1%, provavelmente pela baixa concentração. Para outras concentrações (5; 10; 20; 30; 40 e 50%), houve a formação do halo de inibição, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos 5; 10; 20; 30 e 50%, que diferiram da concentração de 40%. As concentrações 30% e 40% foram as mais efetivas, diferindo significativamente das demais.

O óleo essencial de manjerona nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1% não apresentou nenhum efeito biológico sobre o *S. aureus*. As concentrações 5% e 10% não apresentaram diferença significativa no tamanho do halo; já as concentrações 20; 30 e 40% apresentaram uma variação de tamanho em relação aos resultados do primeiro grupo; porém, entre eles, os valores mantiveram-se constantes; a concentração de 50% foi a que apresentou maior efeito sobre a referida bactéria, quando comparada com as demais.

TABELA 12 - Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais sobre *S. aureus*.

Concentração (%)	Formação do halo de inibição (cm)		
	Anis-estrelado	Manjerona	Canela
0	0	0 a	0 a
0,1	0	0 a	0 a
0,5	0	0 a	0 a
1	0	0 a	0
5	0	0,9 b	4,2 b
10	0	1,13 bc	4,3 b
20	0	1,2 c	4,4 b
30	0	1,2 c	5,18 bc
40	0	1,33 c	5,43 c
50	0	1,6 a	4,4 b

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukei (1974).

Pelos dados da Tabela 13, observa-se que a avaliação do halo de inibição da *E. coli* apresenta resultado similar ao encontrado para *S. aureus*. Com o óleo essencial de manjerona, a CMI foi de 1%, apresentando diferença significativa entre os tratamentos. Em relação ao efeito bactericida do óleo essencial de canela sobre *E. coli*, as concentrações 0,1; 0,5 e 1% não promoveram a inibição do crescimento bacteriano; a concentração mínima inibitória encontrada foi de 5%, a qual apresentou diferença significativa em relação às outras concentrações. O óleo essencial de anis-estrelado promoveu a inibição do crescimento a partir da concentração de 0,5%.

TABELA 13 - Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais sobre *E. coli*.

Concentração (%)	Formação do halo de inibição (cm)		
	Manjerona	Anis-estrelado	Canela
0	0 e	0 d	0 e
0,1	0 e	0 d	0 e
0,5	0 e	0,6 c	0 e
1	1,0 d	0,7 c b	0 e
5	1,05 d	0,88 b a	2,2 d
10	1,1 d c	0,85 b a	2,43 c
20	1,3 c	0,88 b a	2,5 c
30	1,45 ba	0,85 b a	2,83 b
40	1,3 c b	0,9 b a	2,83 b
50	1,6 a	0,95 a	3,05 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukei (1974).

Em relação ao óleo de manjerona, observa-se pelos dados das Tabela 14 que a *Escherichia coli* apresentou-se menos resistente, pois a partir de 1% houve a formação do halo de inibição; sendo que para o *Stapholococcus aureus*, essa ocorreu a uma concentração de 5%. As demais concentrações não apresentaram diferença significativa entre os microrganismos.

TABELA 14 - Valores médios do efeito do óleo essencial de manjerona entre *E. coli* e *S. aureus*.

Concentração(%)	Formação do halo de inibição (cm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphlococcus aureus</i>
0	0 a	0 a
0,1	0 a	0 a
0,5	0 a	0 a
1	1 a	0 b
5	1,05 a	0,9 a
10	1,1 a	1,23 a
20	1,35 a	1,2 a
30	1,45 a	1,2 a
40	1,3 a	1,33 a
50	1,6 a	1,6 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukel.

Pelos resultados referentes ao óleo de canela, representado na Tabela 15, verifica-se que a partir da concentração de 5% houve a formação do halo de inibição para as duas bactérias, porém o *S. aureus* foi mais sensível ao óleo essencial por apresentar o maior halo de inibição com diferença significativa entre as bactérias.

TABELA 15 - Valores médios do efeito do óleo essencial de canela entre *E. coli* e *S. aureus*.

Concentração(%)	Formação do halo de inibição (cm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
0	0 a	0 a
0,1	0 a	0 a
0,5	0 a	0 a
1	0 a	0 a
5	2,2 b	4,0 a
10	2,43 b	4,3 a
20	2,5 b	4,4 a
30	2,83 b	5,18 a
40	2,83 b	5,43 a
50	3,05 a	4,4 a

Médias seguidas com a mesma letra minúscula, na linha, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukel.

Os melhores resultados de inibição para as bactérias foram atribuídos ao óleo essencial de canela, tendo como composto majoritário o aldeído cinâmico. O aldeído cinâmico e o eugenol foram compostos encontrados nos óleos essenciais de *Cinnamomum cássia* e *Cinnamomum verum*, pesquisados por Oussalah et al. (2007). Esses avaliaram a atividade desses óleos no controle de quatro bactérias patogênicas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), observando uma toxicidade desses com microrganismos estudados.

Pereira (2006), avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre *S. auerus* e *E. coli*, encontrou o 4-terpineol (26,3%) como composto majoritário, atribuindo a esse a atividade biológica encontrada.

Vagi et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de manjerona promoveu notável inibição no crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus cereus*. Atribuíram essa atividade à presença do seu componente e majoritário, o 4- terpineol.

Tepe, et al. (2006) estudando o óleo essencial de *Pimpinella anisum* (erva-doce) encontrou como composto majoritário o trans-anetol (82,8%), o mesmo presente no *Illicum verum* (anis-estrelado). Considerando este composto como o responsável pela atividade antimicrobiana com *Strptococcus pneumoniae*, *Bacillus cereu*, *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium perfingens*, *Cândida albicans* e *Candida krusei*.

Para o teste do sinergismo entre os óleos de manjerona, canela e anis-estrelado, observa-se pelos dados da Tabela 16 que não houve efeito sinérgico entre os óleos essenciais testados. Para o *Staphylococcus aureus* a concentração que promoveu a formação do halo de inibição foi de 30% da combinação dos óleos, correspondendo a 50% de cada óleo estudado. A combinação anis-estrelado e manjerona foi a menos eficaz para essa bactéria. A *Escherichia coli* apresentou-se mais sensível ao sinergismo tendo como CMI 5% da combinação

dos óleos essenciais. Para essa bactéria a combinação anis-estrelado e manjerona não se apresentou eficaz.

TABELA 16 - Resultados médios da avaliação do efeito sinérgico dos óleos essenciais estudados sobre a formação do halo de inibição de duas espécies de bactérias.

Bactérias	Concentração (%)	Formação do halo de inibição (cm)		
		Canela/manjerona	Canela/anis-estrelado	Anis-estrelado/manjerona
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
	0,1	0	0	0
	1	0	0	0
	5	0	0	0
	10	1,3	0,88	0
	30	3,58	2,8	1,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0
	0,1	0	0	0
	1	0	0	0
	5	1,08	0,85	0
	10	1,6	1,4	0
	30	2,63	1,85	0,63

5 CONCLUSÕES

Os constituintes majoritários dos óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela foram o 4-terpineol, trans-anetol e aldeído cinâmico, respectivamente.

Os óleos essenciais de manjerona e canela apresentaram efeito inibitório sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*; o óleo essencial de anis-estrelado mostrou atividade antibacteriana apenas com *E. coli*.

A concentração mínima inibitória para o crescimento micelial do *A. flavus* foi de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ do óleo essencial de anis-estrelado.

A concentração mínima inibitória para o crescimento micelial do *A. parasiticus* foi de 0,25; 2 e 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para os óleos essenciais de canela, anis-estrelado e manjerona, respectivamente.

Para a atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados neste estudo, não houve efeito sinérgico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2.ed. The Royal Society of Chemistry, 2000. p. 479.

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

BARBEL, S.; YASHPHE, J. Effect of essential oil from *Achillea fragrantissima* on *Escherichia coli* cells. **Current Microbiology**, Oxford, v. 19, p.337-341, 1989.

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

CARDOSO, M. G. **Boletim agropecuário: plantas aromáticas e condimentares**. Lavras, MG: UFLA, 2005. p. 83.

CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA, D. P. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lpidóptera: *Noctuidae*) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, 2006.

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

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

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

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

- DZIEKAK, J. D. Spices: **Food Technology**, v. 43, p. 102-110, 1989.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4. 0. In: REUNIAO ANUAL DA REGIAO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- FICHI, G.; FLAMINI, G.; ZARALLI, L. J.; PERRUCCI, S. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. **Phytomedicine**, v. 14, p. 227-231, 2007.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005. 424 p.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998. 182 p.
- GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da Estabilidade e do Efeito Fungitóxico do Óleo Essencial de Capim-Limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf)**. 2007. 72 p. Tese (Mestrado em Agrquímica/Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- GULÇIN, I.; OKTAY, M.; KIRÇÇ, E.; KUFREVIOGLUN, O. R. Screening of antioxidant activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, n. 3, p. 371-382, Nov. 2003.
- GROSSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo: Optinline, 2005. 300 p.
- HARBONE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4.ed. London: Academic, 1993. 318 p.
- HARRIS, R. Synergism in the essential oil word. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 179-186, Oct./Dec. 2002.
- HERTWINH, F. I. V. **Plantas aromáticas e medicinais**. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1991. p. 414.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, H. A. P.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey`s manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Maryland: Williams & Wilkins, 1994.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R.; LOPES, L. O.; DAISE & MORSBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, sept./dez. 1997.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oil against foodborn pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, London, 2007.

JUN, W. J.; HAN, B. K.; YU, K. W.; KIM, M. S.; CHAM-NG, I. S.; KIM, H. Y.; CHO, H. Y. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. **Food Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 439-444, Dec. 2001.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio d Janeiro, v. 10, n. 2, p. 71-77, ago./dez. 2003.

LIMA, M. P.; ZOGHBI, M. G.; ANDRADE, E. H.; SILVA, T. M.; FERNANDES, C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) **Acta Amazônica**, v. 35, n. 3 p. 363-366, 2005.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1997. 128 p.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**. 2003. v. 23, n. 2, 49p.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas, condimentos**. São Paulo: Bei Comunicações, 2003. p. 254.

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

OMIDBEYGI, M.; BARZEGAR, M.; HAMIDI, Z.; NAGHDIBADI, H. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. **Food Control**, Guildoford, v. 18, n. 12, p. 1518-1523, Dec. 2007.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. 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**, Guildoford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

OZTURK, S.; ERCISLI, S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. **Food Control**, Guildoford, v. 18, n. 5, p.535-540, May 2007.

PATKAR, K.L.; USHA, C. M.; SHETTY, H. S.; PASTER, N.; LACEY, J. Effect of spice oils on growth and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 49-51, 1993.

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

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSENCA, E. W. N.; PICOLLI, R. H. Inibição de desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências Agrotecnológica**, Lavras, v. 30, n. 4 p. 731-738, jul./ago. 2006.

PIMENTEL, F. A. **Avaliação Fungitóxica e Caracterização Química dos Óleos Essenciais e Extratos obtidos após diferentes processos de extração de cipó vick (*Tanaecium nocturnum*) e João-brandim (*Piper piscatorum*)**. 2007. 179 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

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

ROOPA, A. P.; SEMWAL, A. D.; SHARMA, G. K.; AGATHIAN, G.; BAWA, A. S. Star-anise (*Illicium verum*) and black caraway (*Carum nigrum*) as natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 104, n. 1, p. 59-66, 2007.

SALGADO, A. P. S. P. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus ulgaris*)** 2005. 48 p. Dissertação (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICKS, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, RS: UFSC, 2004.

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

SENHAJI, O.; FAID, M.; KALALOU, I. Inactivation of *Escherichia coli* O1557:H7 by essential oil from *Cinnamomum zeylanicum*. **Brasilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador v. 11, n. 2, Apr. 2007.

SHARVERDH, A. R.; MONSEF-ESPAHANI, H. R.; TAVASOLI, F.; ZAHERI, A.; MIRJANI, R. Trans-Cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* Bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, 2007.

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

SIMÕES, C. M.; SPITZEER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICKS, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, RS: UFSC, 2004.

SINGH, G.; MAURYA, S. LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. **Food control**, Guildoford, v. 17, n. 9, p. 745-752, Sept. 2006.

- SINHA, K. K.; SINHA A. K.; GANJENDRA, P. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 114-117, 1993.
- SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciências Agrotecnológica de Lavras**, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun. 2004.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis, SC: Insular, 1998. p. 143.
- TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; OZEK, T.; KIRIMER, N.; BASER, K. H.; BDIR, E.; KHAN, I. A.; WDGE, D. E. Gás chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from central and Northern Turkey. **Journal of chromatography A**, v. 1117, p. 194-205, 2006
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre, RS: Artemed, 2004. 719 p.
- TEPE, B.; AKPULAT, A.; SOKMEN, M.; DAFERERA, D.; YUMRUTAS, O.; AYDIN, E.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Screening of the atioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. **Food Chemistry** v. 97, n. 1, p. 719-724, 2006.
- TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- TUAN, D. Q.; ILANGANTILEKE, S. G. Liquid CO₂ extraction of essential oil from star anise fruits (*Illicium verum* H.) **Journal of Food Engineering**, v. 31, p. 47-57, 1997.
- VAGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, A.; HETHELYI, E. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide **Food Research International**, v. 38, n.1, p. 51-57, 2005.
- VERA, R. R.; CHANE-MING, J. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana*) from Reunion Island. **Food chemistry**, v. 66, n. 2, p. 143-145, Aug. 1999.

WANG, S.Y.; CHEN, P.F.; CAHNG, S. T. Antifungal activities of essential oils their constituents from *Indigenus cinnamom* (*Cinnamomum osmoplaloeum*) leaves against wood decay fungi. **Bioresource Tecnology**, Oxford, v. 96, n. 7, p. 813–818, May 2005.

WINK, M. Physiology of secundar produts formation in plants. In: CRARWOOD, B.; RHODES, M. J. C. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Claredon, 1990. p. 23-42.

ANEXOS

ANEXO A

		Página
TABELA 1A	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	65
TABELA 2A	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado sobre o fungo <i>Aspergillus parasiticus</i>	65
TABELA 3A	Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de manjerona entre <i>Aspergillus parasiticus</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	66
TABELA 4A	Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de anis-estrelado entre <i>Aspergillus parasiticus</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	66
TABELA 5A	Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado sobre o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	66
TABELA 6A	Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre o fungo <i>Aspergillus parasiticus</i>	67
TABELA 7 ^a	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona e canela sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	67
TABELA 8A	Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre	

	a bactéria <i>Escherichia coli</i>	68
TABELA 9A	Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de manjerona entre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	68
TABELA 10A	Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de canela entre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	68

TABELA 1A - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre o fungo *Aspergillus flavus*.

manjerona CV= 14,18				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	5	24,409167	98,678	0,0000
Erro	18	0,247361		

Anis-estrelado CV= 53,28				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	5	32,856725	14,849	0,0000
Erro	18	2,212762		

canela CV=9,35				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concetração	5	12,980167	90,823	0,0000
Erro	18	0,142917		

TABELA 2A - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado sobre o fungo *Aspergillus parasiticus*.

manjerona CV= 8,39				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	5	43,402104	669,513	0,000
Erro	18	0,064826		

Anis-estrelado CV= 5,05				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	5	39,596000	1436,228	0,0000
Erro	18	0,027569		

TABELA 3A - Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de manjerona entre *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*.

CV= 12,08				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	5	65,788844	421,470	0,0000
Fungos	1	2,683802	17,194	0,0002
C x F	5	2,022427	12,956	0,000
Erro	36	0,156094		

TABELA 4A - Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de anis-estrelado entre *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus*.

CV= 6,27				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	5	79,594333	2199,920	0,0000
Fungos	1	3,050208	84,305	0,000
C x F	5	0,466083	12,882	0,000
Erro	36	0,036181		

TABELA 5A - Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona e anis-estrelado sobre o fungo *Aspergillus flavus*.

CV= 4,62				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	3,723312	52,626	0,000
Erro	15	0,070750		

TABELA 6A - Análise de variância do efeito sinérgico entre os óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre o fungo *Aspergillus parasiticus*.

Anis x manjerona CV= 4,5				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	20,059375	491,752	0,0000
Erro	15	0,040792		

Anis-estrelado x canela CV= 8,42				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	4	21,735313	146,448	0,000
Erro	15	0,148417		

Canela x manjerona CV= 3,41				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentração	4	21,846375	1018,083	0,0000
Erro	15	0,021458		

TABELA 7A - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona e canela sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

Canela CV= 8,80				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	9	11,826722	196,204	0,0000
Bloco	1	0,050000	0,829	0,3862
Erro	9	0,060278		

Manjerona CV= 7,86				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	9	0,859778	257,933	0,0000
Bloco	1	0,012500	3,750	0,0848
Erro	9	0,003333		

TABELA 8A - Análise de variância do efeito inibitório dos óleos essenciais de manjerona, anis-estrelado e canela sobre a bactéria *Escherichia coli*.

manjerona CV= 6,30				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	9	0,812278	261,089	0,0000
Bloco	1	0,002000	0,643	0,4433
Erro	9	0,003111		

Anis-estrelado CV= 8,30				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	9	0,262833	87,611	0,0000
Bloco	1	0,000500	0,167	0,6926
Erro	9	0,003000		

canela CV=2,63				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentração	9	3,820292	2200,488	0,000
Bloco	1	0,003125	0,003125	0,2126
Erro	9	0,001736	0,001736	

TABELA 9A - Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de manjerona entre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

CV= 15%				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	9	1,57861	106,612	0,0000
Bactérias	1	0,002250	0,152	0,7004
C x B	9	0,098194	6,652	0,0002
Erro	20	0,014763		

TABELA 10A - Análise de variância do efeito inibitório do óleo essencial de canela entre *E. coli* e *S. aureus*.

CV= 39,3%				
FV	GL	QM	Fc	Pr > F
Concentrações	9	14,377563	19,655	0,0000
Bactérias	1	0,003063	0,004	0,9491
C x B	9	1,152118	1,575	0,1900
Erro	20	0,731488		