

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum*
zeylanicum, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber*
officinale: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA**

MILENE APARECIDA ANDRADE

2010

MILENE APARECIDA ANDRADE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e
Zingiber officinale: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA**

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

Orientadora

Prof^ª. Dr^ª Maria das Graças Cardoso

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Andrade, Milene Aparecida.

Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana / Milene Aparecida Andrade – Lavras: UFLA, 2010.

83 p. : il.

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

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Plantas condimentares. 3. Propriedades biológicas. 4. Canela. 5. Citronela. 6. Gengibre. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.53

MILENE APARECIDA ANDRADE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e
Zingiber officinale: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

UFLA

Prof. Dra. Samísia M. Fernandes Machado

UFS

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

À minha mãe, **Onilda**, e à minha avó-mãe, **Marica**, pessoas a quem eu amo mais do que sou capaz de dizer e eu sempre sentirei muitas saudades.

OFEREÇO

Ao meu grande amor, **Otávio**, que mesmo tão longe, continua sendo meu porto seguro.

DEDICO

“ (...) Cada um de nós compõe a
sua história, cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz, e ser feliz.”

AGRADECIMENTOS

A Deus por indicar o caminho e dar-me forças para segui-Lo;

À minha família, que mesmo longe, incentivaram-me com sua torcida e confiança.

À minha orientadora, professora e amiga, Maria das Graças Cardoso, pela harmônica orientação, cujos ensinamentos profissionais e pessoais serão levados comigo por toda a vida...

Ao professor Luís Roberto Batista (DCA-UFLA), pela coorientação precisa, pela confiança em mim depositada e disposição em ajudar-me sempre.

À professora Prof. Dra. Samísia M. F. Machado e ao Prof. Dr. Péricles Barreto Alves (UFS), pelas análises cromatográficas.

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

Aos colegas e amigos do curso de Agroquímica, em especial, Roberta, Elaine, Eliane, Jake, Thaís, Stefânia, Marcus, Anderson e Paulo, pela amizade e convivência ao longo do curso.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica, Juliana, Lucilene, Luiz Gustavo, Renata, Maria Luiza, Marcos, Cínthia, Lidy, Felipe, Ana, João, Wilder, Rodrigo, pelo companheirismo e amizade, e principalmente, à Aline, pela colaboração na condução do experimento.

Às minhas amigas de república, Renata e, principalmente, à LÍlian pela amizade de longa data, pela ajuda em todas as horas e por agüentar-me nos momentos de crise...

Às “meninas” Cláudia e Sílvia, à Juliana e ao meu eterno amigo, Jean, pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Thales, Rodriguinho, Alexandre, Alezinha, Alessandra, Manú, Maíra, Danilo e

Naty, e a técnica Eliane, do Laboratório de Micologia de Alimentos, Elis, Daiane, Fabi, Chris, Josy, Mariana, Michele, Abiah e Mônica, pela convivência agradável e pela ajuda no decorrer do experimento.

Aos funcionários do Departamento de Química, às secretárias Miriam, Ana Cristina, Shirley e a técnica Xulita, pela convivência e prestabilidade.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química, pela oportunidade e à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos que durante esses dois anos contribuíram direta ou indiretamente para este momento.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Plantas aromáticas, medicinais e condimentares	3
2.2 Metabólitos secundários.....	3
2.3 Óleos essenciais	6
2.3.1 Biossíntese de terpenoides	8
2.3.2 Biossíntese de fenilpropanoides.....	11
2.4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais	13
2.5 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais	16
2.6 Bactérias patogênicas encontradas em alimentos.....	19
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	22
2.6.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.6.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.6.5 <i>Salmonella Cholerasius</i>	25
2.7 Canela-da-índia (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	26
2.8 Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	28
2.9 Capim-citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Obtenção do material vegetal	31

3.2 Extração do óleo essencial	31
3.2.1 Determinação da umidade	31
3.3 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais...	32
3.4 Atividade biológica dos óleos essenciais.....	33
3.4.1 Manutenção e ativação das culturas bacterianas.....	33
3.4.2 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias.....	34
3.4.2.1 Teste de Difusão Cavidade em Agar.....	33
3.4.3 Análise estatística.....	34
3.5 Atividade antioxidante.....	35
3.5.1 Sistema β caroteno/ácido linoleico.....	35
3.5.1.1 Análise estatística.....	36
3.5.1.2 Método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2- picrilidrazila).....	36
3.5.1.2 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Rendimento.....	38
4.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	39
4.2.1 <i>Cymbopogon nardus</i> (Capim-citronela).....	39
4.2.2 <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela).....	41
4.2.3 <i>Zingiber officinale</i> (Gengibre).....	43
4.3 Atividade antibacteriana	45
4.4 Atividade antioxidante.....	50
5 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	72

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	2,6-di-terc-butil-4-metilfenol
BHA	2-terc-butil-4-hidroxianisol
BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
BLU	Base livre de umidade
CG-DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI ₅₀	Concentração de 50% de inibição
CL	Cloranfenicol
CMI	Concentração Mínima Inibitória
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril- CoA
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DMAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DTA	Doença Transmitida por alimento
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
EPEC	Enteropatogênica clássica
EIEC	Enteroinvasiva
ETEC	Enterotoxogênica
EHEC	Entero-hemorrágica
DAEC	Difusamente adesiva
EAggEC	Enteroagregativa
GPP	trans-geranilpirofosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
IPP	Isopentil-pirofosfato
FAL	Fenilalanina amonialiase

PG	Galato de propila
RNA	Ácido ribonucleico
TSA	Tryptic soy Agar
TSB	Tryptic soy Broth
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.....	5
FIGURA 2 Estrutura química do isopreno.....	8
FIGURA 3 Biossíntese de terpenos via mevalonato.....	10
FIGURA 4 Biossíntese de terpenos via DXPS.....	11
FIGURA 5 Representação química básica de um fenilpropanoide...	11
FIGURA 6 Biossíntese de fenilpropanoides.....	12
FIGURA 7 Estruturas químicas dos principais antioxidantes utilizados na indústria(a) α - Tocoferol, (b) BHT, (c) BHA, (d) PG e (e) TBHQ.....	15
FIGURA 8 Aspecto geral da espécie canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>).....	27
FIGURA 9 Aspecto geral da espécie gengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	29
FIGURA 10 Aspecto geral da espécie capim-citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	30
FIGURA 11 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> (a) Citronelal, (b) Citronelol e (c) Geraniol.....	41
FIGURA 12 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> . (a) 1,8-Cineol, (b) Acetato de cimamila e (c) Aldeído cinâmico.....	43
FIGURA 13 Estruturas químicas dos compostos majoritários	

	presentes no óleo essencial de <i>Zingiber officinale</i> . (a) Neral, (b) Geranial, (c) Geraniol, (d) 1,8-Cineol, (e) Canfeno e (f) Acetato de geranila.....	45
FIGURA 14	Fotografias do último dia de experimento para a avaliação do efeito inibitório do óleo <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , sobre (a) <i>Escherichia coli</i> , (b) <i>Listeria monocytogenes</i> , (c) <i>Staphylococcus aureus</i> , (d) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e (e) <i>Salmonella Cholerasuis</i>	47

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Rendimentos dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i>	38
TABELA 2 Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Cymbopogon nardus</i>	40
TABELA 3 Composição química do óleo essencial da casca de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	42
TABELA 4 Composição química do óleo essencial dos rizomas de <i>Zingiber officinale</i>	44
TABELA 5 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> encontrada para os micro-organismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella Cholerasuis</i>	46
TABELA 6 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> e dos padrões Timol, Ácido ascórbico pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)...	51

RESUMO

ANDRADE, Milene Aparecida. **Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale***: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana. 2010. 83p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Atualmente tem-se observado uma crescente busca por produtos naturais, tanto para a utilização em indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos, como para utilização na agricultura. Entre os produtos de origem vegetal, os óleos essenciais, pertencentes à classe dos metabólitos secundários, vêm se destacando por suas atividades biológicas. Nesse contexto, objetivou-se neste estudo caracterizar quimicamente e avaliar as atividades antioxidante e antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*. A obtenção do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado, e a identificação e quantificação dos constituintes, pelas análises em CG/EM e CG-DIC. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da técnica Difusão cavidade em ágar, utilizando os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e o método de sequestro de radicais DPPH. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. nardus* foram citronelal (47,12%), geraniol (18,56%), e citronelol (11,07%), no óleo essencial de *C. zeylanicum* foram identificados (E)- cinamaldeído (77,72%), acetato de (E)-cinamila (5,99%) e o monoterpenoide 1,8-cineol (4,66%) como componentes majoritários, e para *Z. officinale* os majoritários foram geraniol (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geraniol (4,19%) e o canfeno (4,30%). Os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana satisfatória, tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas, sendo o óleo essencial de *C. zeylanicum* o mais eficiente. A atividade antioxidante foi evidenciada pelo teste β -caroteno/ácido linoleico para *C. nardus*, seguido de *Z. officinale* e *C. zeylanicum*, respectivamente, e pelo teste do DPPH, foi observada apenas para *C. nardus*.

*Comitê Orientador: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Orientadora) e Luís Roberto Batista – UFLA

ABSTRACT

ANDRADE, Milene Aparecida. **Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale***: chemical characterization and antioxidant and antibacterial activity. 2010. 83p. Dissertation (Master's in Agrochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras.*

Currently an increasing search for natural products has been observed, for use in the pharmaceutical, nutrition and cosmetics industries, as well as in agriculture. Among the products of vegetable origin, the essential oils, belonging to the class of the secondary metabolites, stand out for their biological activity. In this context, the objective of this study consisted of chemically characterizing and evaluating the antioxidant and antibacterial activity of the essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* and *Zingiber officinale*. The obtaining of the essential oil was conducted using the hydrodestillation technique through a modified Clevenger apparatus and the identification and quantification of the constituents by GC/MS analyses and GC-FID. The evaluation of the antibacterial activity was accomplished through the agar well diffusion technique, using the microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. The antioxidant activity was evaluated using β - carotene/ linoleic acid system and the DPPH radical scavenging method. In the chromatographic analyses the major constituents found in the *C. nardus* essential oil were citronellal (47.12%), geraniol (18.56%), and citronellol (11.07%), in the essential oil of *C. zeylanicum* (E)- cinnamaldehyde (77.72%), (E)- cinnamyl acetate (5.99%) and the monoterpenoid 1,8-cineol (4.66%) as majority components, and for *Z. officinale* the majority were geraniol (25.06%), neral (16.47%), 1,8-cineol (10.98%), geraniol (8.51%) and geranyl acetate (4.19%), and camphene (4.30%). The essential oils presented satisfactory antibacterial activity, for Gram-negative bacteria as well as for Gram-positive, except for the species *E. coli* that showed the most resistant, since the inhibitory effect of *C. nardus* and *Z. officinale* essential oils was not verified. The antioxidant activity was evidenced by the β - carotene/ linoleic acid test for *C. nardus*, followed by *Z. officinale* and *C. zeylanicum*, respectively and by the DPPH test it was only observed for *C. nardus*.

*Guidance Committee: Maria das Graças Cardoso – UFLA (Advisor) and Luís Roberto Batista – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais por seres humanos data de milhares de anos devido às suas propriedades medicinais e nutricionais. Muitos compostos naturais presentes nas plantas, ervas e condimentos têm apresentado atividade biológica e servem como fonte de agentes antimicrobianos contra diversos patógenos. Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, metabólitos secundários voláteis que se caracterizam por serem misturas complexas de compostos orgânicos responsáveis pela qualidade da essência. Entretanto, alguns contêm um componente majoritário em elevada concentração.

Os óleos essenciais ocupam um lugar preponderante nas indústrias de insumo farmacêutico, agroalimentícias, perfumaria e cosméticos. As exportações brasileiras de óleos essenciais e produtos derivados deles estão em alta. De janeiro de 2005 a outubro de 2008, os embarques desses produtos renderam US\$ 309,5 milhões, referentes a 119.772 toneladas de óleos, 95% de óleos cítricos (Bizzo et al., 2009).

O interesse pelos óleos essenciais está baseado não somente na possibilidade de obtenção de compostos aromáticos (odor agradável), mas também daqueles possuidores de propriedades terapêuticas ou, ainda, de compostos precursores de substâncias de elevado valor agregado.

Tendo em vista os problemas de resistência a antibióticos e desinfetantes convencionais, e diante da atual tendência do mercado de utilizar produtos naturais, a utilização de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudada, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e micro-organismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (Santos, 2004).

Na indústria alimentícia, os óleos essenciais, além de conferirem aroma

e sabor aos alimentos, possuem importantes atividades antioxidante e antimicrobiana, que podem potencializar o seu uso. Em razão da importância crescente dos óleos essenciais no mercado mundial e da diversidade de espécies existentes, ainda inexploradas, são necessários mais estudos que viabilizem o uso dessas plantas.

Diante do exposto, objetivou-se nesta pesquisa caracterizar quimicamente e avaliar as atividades antioxidante, antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (capim-citronela), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Zingiber officinale* (gengibre).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas aromáticas, medicinais e condimentares

As plantas medicinais, condimentares e aromáticas são utilizadas pelo homem desde a Antiguidade, na alimentação, na cura de doenças e também na agricultura. No Brasil, o emprego das plantas está presente desde antes da colonização, quando índios já as utilizavam e, em seguida, passaram seus conhecimentos para os colonizadores, tornando-as amplamente utilizadas na medicina caseira (Mendonça, 2004).

As plantas aromáticas são definidas como aquelas que possuem aroma ou perfume capazes de sensibilizar nosso olfato de forma agradável, as plantas medicinais como aquelas que, dependendo da concentração do seu princípio ativo, podem apresentar toxicidade ou propriedades curativas e as plantas condimentares são usadas como tempero, para realçar o sabor e o aspecto dos alimentos, podendo apresentar propriedade de conservação (Upnmoor, 2003).

Nas últimas décadas, tem-se observado uma crescente busca por produtos naturais com atividades biológicas que minimizem o impacto ambiental e na saúde causado por diversas substâncias sintéticas. As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas e, embora os vegetais contenham milhares de constituintes químicos, as propriedades relacionadas a elas estão especialmente ligadas aos chamados metabólitos secundários.

2.2 Metabólitos secundários

Os vegetais sintetizam compostos, que são divididos em dois grandes grupos: metabólitos primários, como a celulose, lignina, proteínas e outras substâncias, que são originadas do metabolismo primário, realizam suas

principais funções vitais e que fazem parte da atividade celular de praticamente todos os seres vivos e os metabólitos secundários, originados do metabolismo secundário, que são substâncias de baixo peso molecular, geralmente produzidas em pequenas quantidades, que possuem características químicas muito variadas e, às vezes, bem complexas e que são responsáveis por funções nem sempre bem definidas, mas nem por isso menos importante (Dewick, 2002).

O metabolismo secundário responde a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica. Fatores tais como fertilidade e tipo de solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica, entre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais. Além desses, há interações e adaptações coevolutivas complexas que se produzem entre planta-planta, planta-animal e planta-micro-organismo de um dado ecossistema (Alves, 2001).

Durante muito tempo, acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, simplesmente como produtos finais das reações. Chegaram a ser considerados até como anomalias; porém, com o surgimento de estudos relacionados com as plantas, tem-se descoberto cada vez mais sobre a função dessas substâncias, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos (Simões et al., 2007).

Os metabólitos secundários despertam grande interesse pelas atividades biológicas exercidas nas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente e também pela sua grande atividade farmacológica. Muitos são de importância comercial nas áreas farmacêutica, alimentar, agronômica, perfumaria e outras (Pereira, 2006).

De acordo com Simões et al. (2007), os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados; porém, todos eles originam-se

do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato, conforme demonstrado na Figura 1.

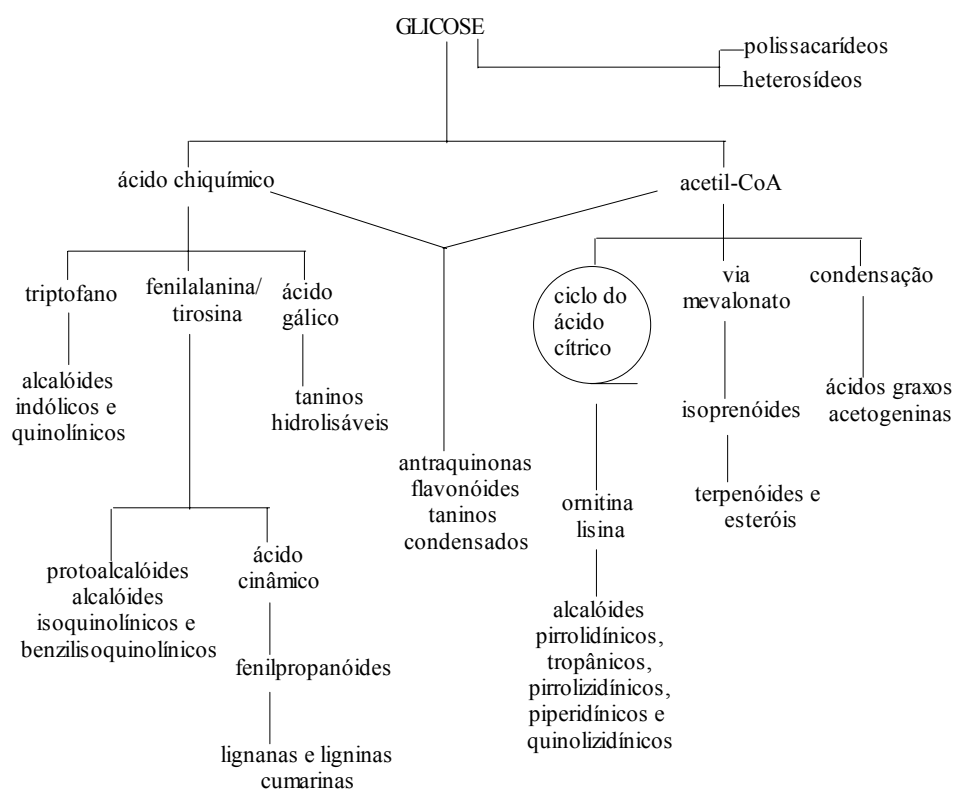


FIGURA 1 Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários (Simões et al., 2007).

Segundo Pereira (2006), entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com maior atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais.

2.3 Óleos essenciais

Dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os óleos essenciais destacam-se por sua grande importância terapêutica e econômica, representando a segunda classe de compostos naturais, com maior número de constituintes ativos.

Óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água, bem como produtos obtidos por pressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). Também são chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Esses óleos são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos que apresentem alto teor de azulenos, como o óleo essencial extraído da camomila e mil-folhas (Simões et al., 2007).

São misturas complexas de substâncias orgânicas lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas que apresentam como propriedades físico-químicas volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que podem catalizar reações de decomposição e transformação, uma vez que dada a sua complexa composição, apresentam alta probabilidade de sofrer modificações físico-químicas devido às reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (Bandoni & Czepak, 2008).

Em angiospermas monocotiledôneas e gimnospermas (exceto coníferas), a ocorrência de óleos essenciais é relativamente rara, com exceção de gramíneas e zingiberáceas. Plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae, entre outras (Simões et al., 2007).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células

parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (Simões et al., 2007).

No ambiente natural, os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra bactérias, fungos, vírus, insetos e herbívoros, e também na atração de alguns insetos e outros agentes fecundadores, como pássaros e morcegos (Bakkali et al., 2008).

A composição dos óleos essenciais está constantemente em transformação, mudando as proporções de seus constituintes ou transformando-se uns constituintes em outros, segundo a parte da planta, o momento do seu desenvolvimento ou o momento do dia podendo também ser determinada geneticamente, variando de acordo com a origem botânica, o quimiotipo, fatores da natureza e o procedimento de cultivo das plantas e de obtenção. Ela varia conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita, tipo de adubação, mas os principais constituintes responsáveis pelo aroma parecem permanecer constantes (Elpo & Negrelle, 2006; Bandoni & Czepak, 2008).

Os óleos essenciais são formados por inúmeros compostos de origens biossintéticas distintas, que vão desde hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e até compostos sulfurados. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, porém, geralmente um, dois ou três deles são

encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários. Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos voláteis pertencem de forma quase exclusiva a duas séries, caracterizada por suas origens biossintéticas distintas: a série terpênica e a série, muito menos frequente, dos fenilpropanoides (Cardoso et al., 2001; Bandoni & Czepak, 2008).

2.3.1 Biossíntese de terpenoides

Os terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética é o isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 2). A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se pela rota do ácido mevalônico. Os esqueletos de carbono dos terpenoides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Simões et al., 2007).

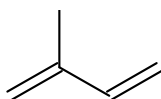


FIGURA 2 Estrutura química do isopreno.

Os terpenoides são sintetizados via mevalonato no citoplasma. Esse é formado por condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA, seguida de uma hidrólise, formando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA). Em seguida, o HMG-CoA é reduzido por um processo que depende de NADPH e é catalisado pela HMGCoA-redutase a mevalonato que, por sua vez, é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilililpirofosfato (DMAPP) (Figura 3) (Simões et al., 2007).

Recentemente demonstrou-se que a produção do IPP pode também ocorrer no cloroplasto (plastídios), pela via 1-deoxi-D-xilulose conhecida como via DXPS, iniciando com a condensação de uma molécula de piruvato e outra D-gliceraldeído-3-fosfato, formando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; após reações sucessivas, a molécula de IPP e de DMAPP são formadas (Figura 4). As moléculas de IPP e DMAPP formadas em ambas as vias condensam-se e originaram o trans-geranilpirofosfato (GPP), o qual é convertido nos diferentes monoterpenos. Devido à polimerização do trans-geranilpirofosfato com IPP, são formadas cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono, que dará origem aos monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos) e assim por diante (Dewick, 2002).

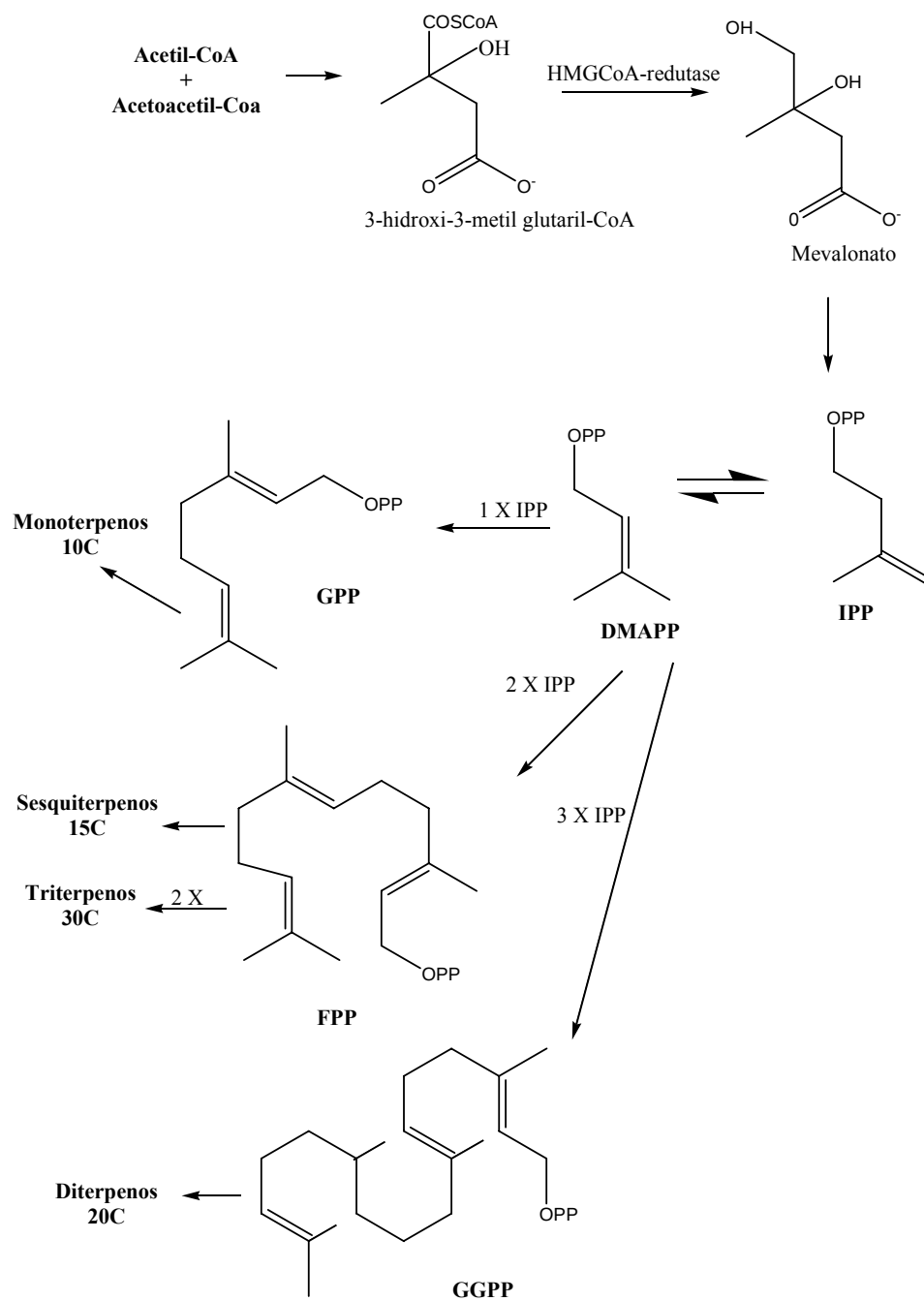


FIGURA 3 Biossíntese de terpenos via mevalonato (Simões et al., 2007)

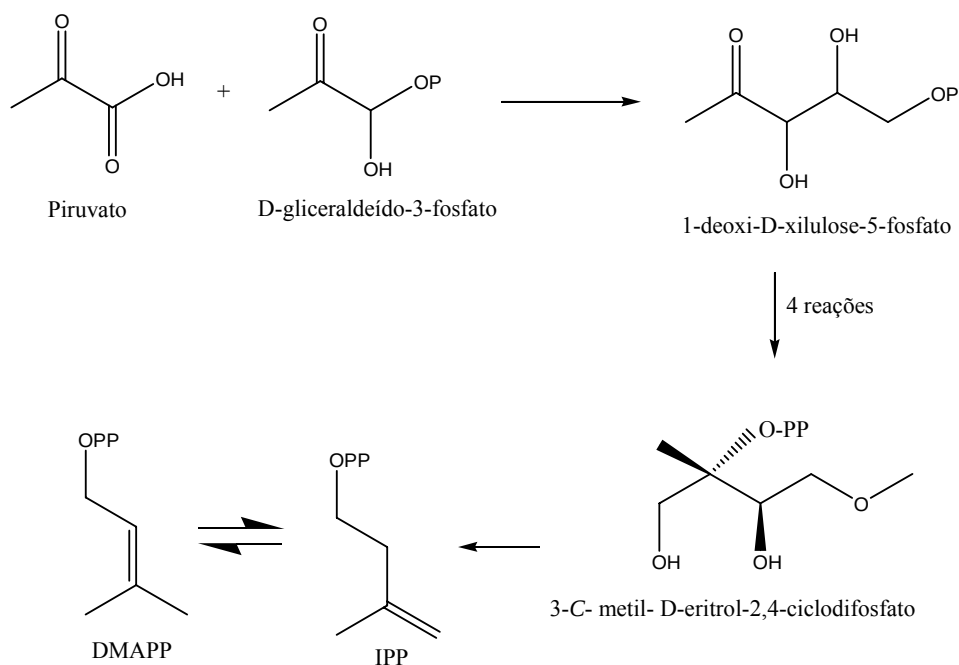


FIGURA 4 Biossíntese de terpenos via DXPS (Dewick, 2002)

2.3.2 Biossíntese de fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são menos abundantes do que os terpenoides e possuem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresentam uma dupla ligação e podem ter um grupo funcional com oxigênio, como representado na Figura 5 (Taiz & Zeiger, 2004).

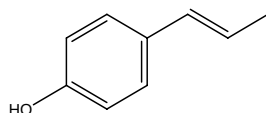


FIGURA 5 Representação química básica de um fenilpropanoide.

Os fenilpropanoides são compostos aromáticos que derivam da rota que se inicia com a formação do ácido chiquímico. Esse é formado pela condensação

aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato que, por sua vez formam a fenilalanina e a tirosina; pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), essas perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico, que apresentam em sua estrutura uma cadeia lateral que contém três átomos de carbono ligados ao anel aromático (Figura 6). Finalmente, por meio de várias reações de redução, oxidação e ciclização, os ácidos cinâmico e p-cumárico levam à formação de fenilpropanoides. (Simões et al., 2007).

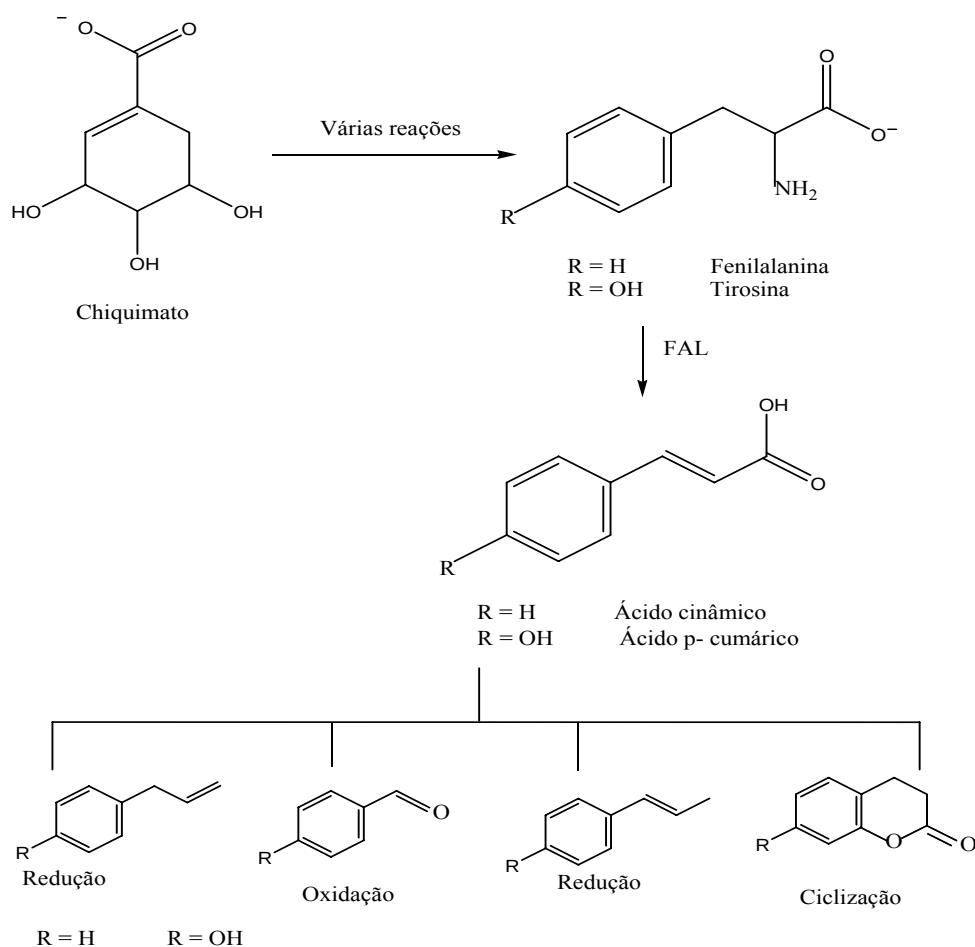


FIGURA 6 Biossíntese de fenilpropanoides (Simões et al., 2007)

2.4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Atualmente, com a tendência do mercado de utilizar produtos naturais, os óleos essenciais estão sendo cada vez mais estudados como agentes antioxidantes, na tentativa de propiciar o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de substâncias oxidantes (Santos, 2004).

Substâncias antioxidantes são aquelas que inibem e/ou diminuem os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes em substratos oxidáveis. Essas substâncias podem ser enzimáticas, como as superóxido dismutases, catalase, e glutathione peroxidase, ou não enzimáticas, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (Halliwell, 2001).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Radical livre é o termo utilizado para designar qualquer átomo ou molécula, com existência independente, apresentando em sua estrutura atômica um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, conferindo maior reatividade em relação às espécies não radicalares. Essas moléculas são produzidas em situações fisiológicas ou patológicas por mecanismos diferentes, como na respiração celular, e reações de oxidação, podendo ser danosas as células quando produzidos em excesso (Gutierrez, 2002).

Esses radicais apresentam-se altamente reativos, embora sua reatividade varie ao longo de um amplo espectro, devido à presença de elétrons desemparelhados. São exemplos desses radicais substâncias que podem apresentar o elétron livre centrado em átomos de oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, carbono ou enxofre, além de átomos de metais de transição. Dada a sua alta reatividade, essas substâncias podem danificar diversas biomoléculas, como lipídios, proteínas e os ácidos nucleicos (Halliwell, 2001).

O oxigênio (O_2) envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em espécies reativas do oxigênio, como: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), 1O_2 (oxigênio singlete), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico ($L^{\bullet}$), entre outros (Wickens, 2001; Gutierrez, 2002).

As espécies reativas de oxigênio, conhecidas também como radicais livres, são geradas pelo processo de transferência de elétrons, ou pela absorção de energia pelo oxigênio, uma vez que o oxigênio é uma molécula muito reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar outros agentes quimicamente reativos (Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000).

Radicais livres desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo e consequentemente atacar e danificar praticamente qualquer molécula encontrada no organismo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer. São tão ativos que, uma vez formados, ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Ao fazê-lo, eles podem transferir seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de formar um par. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, mas a molécula atacada, em si, transforma-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente sobre um tecido (Soares et al., 2005).

Na indústria de alimentos, os antioxidantes sintéticos mais utilizados para controlar a oxidação lipídica são os compostos fenólicos butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (Figura 7); porém, estudos relacionados com a toxicologia desses compostos têm demonstrado a possibilidade de eles apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais, por isso, o uso de antioxidantes sintéticos é restrito em vários países. No Brasil, o uso dessas

substâncias antioxidantes é controlado pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio da RDC Nº 64, de 16 de setembro de 2008, limitando as concentrações máximas de uso para $0,02\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para TBHQ, BHA, BHT e PG e $0,15\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ para α -tocoferol. (Kahl & Kappus, 1993; Ramalho & Jorge, 2006; Brasil, 2008).

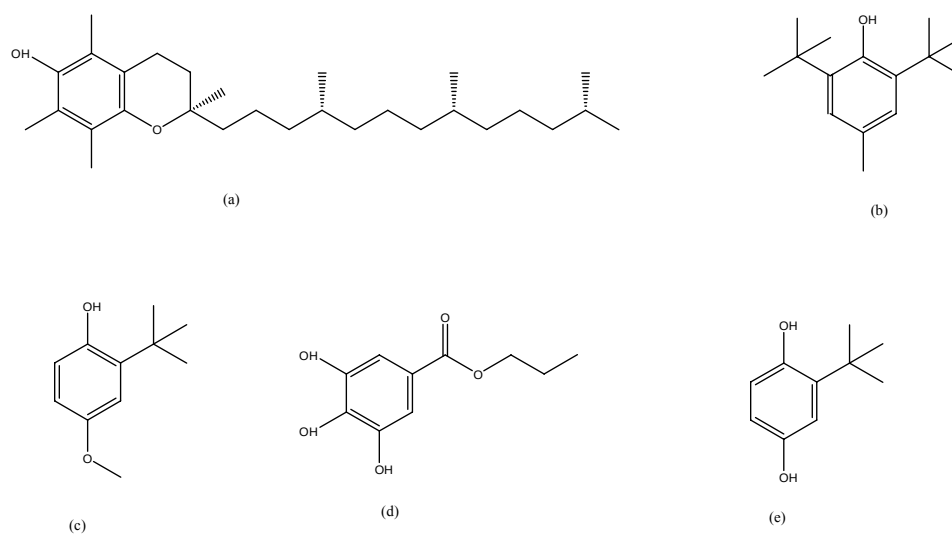


FIGURA 7 Estruturas químicas dos principais antioxidantes utilizados na indústria (a) α -Tocoferol, (b) BHT, (c) BHA, (d) PG e (e) TBHQ.

Diante dos possíveis problemas causados pelos antioxidantes sintéticos, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, que permitirão a substituição dos sintéticos ou fazer associações entre eles, com a finalidade de diminuir sua quantidade nos alimentos.

Muitos componentes produzidos por plantas têm sido objeto de pesquisas em relação ao potencial antioxidante, demonstrando resultados promissores. Entre eles têm-se os óleos voláteis (Mantle et al., 1998; Ruberto & Baratta, 2000; Kulisic et al., 2004; Moraes et al., 2006; Wang et al., 2008; Cao et

al., 2009) e componentes não voláteis testados na forma de extratos (Tepe et al., 2005; Mata et al., 2007; Stoilova et al., 2007; Singh et al., 2008; Chan et al., 2008; Safaei-Ghomi et al., 2009).

Muitas plantas aromáticas e especiarias têm se mostrado eficazes em retardar o processo de peroxidação lipídica em óleos e alimentos gordurosos e ganharam o interesse de muitos grupos de pesquisa (Soares, 2002; Kulisic et al., 2004).

De acordo com Carvalho (2004), citado por Lima (2008), a presença de compostos contendo um ou mais grupos hidroxila (OH), ou metoxila (CH_3O) ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons disponíveis para serem doados, nos óleos essenciais, conferem a eles atividade antioxidante. O grupo metóxi é um forte grupo doador de elétron, o que aumenta a estabilidade do anel benzênico, resultando em aumento da atividade sequestradora de radicais livres (Zhang et al., 2006).

Ruberto & Baratta (2000), avaliando a atividade antioxidante de aproximadamente 100 compostos que compõem os óleos essenciais, verificaram que, de um modo geral, os compostos fenólicos apresentaram a maior atividade antioxidante, seguido dos componentes oxigenados e dos alcoóis alílicos. Alguns hidrocarbonetos monoterpênicos, como terpinoleno, α - e γ -terpineno, mostraram uma significativa ação protetora e hidrocarbonetos sesquiterpênicos e não-isoprenoides submetidos a este estudo, demonstraram um baixo, ou nenhum, efeito antioxidante.

2.5 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A maior aplicação biológica dos óleos essenciais ocorre como agentes antimicrobianos. Essa capacidade, presente na maioria desses compostos, de certa maneira, irá representar uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias e fungos fitopatogênicos. O modo de ação

que provoca a inibição de micro-organismos por óleos essenciais e seus compostos químicos envolve diferentes mecanismos, dependendo dos componentes majoritários do óleo essencial (Citó et al., 2003; Souza et al., 2005).

Diante da complexidade da composição química dos óleos essenciais, a sua atividade antibacteriana não pode ser explicada por um único mecanismo de ação, pois todos os componentes da célula bacteriana tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos (Carson et al., 2002). Segundo Burt (2004), nem todos os efeitos antimicrobianos resultam diretamente da atuação dos óleos essenciais na célula bacteriana; alguns ocorrem como consequências dos efeitos iniciais.

Uma importante característica dos óleos essenciais é a lipofilicidade, o que permite que os óleos passem através da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, quebrando-os e, assim, alterando a permeabilidade dessas organelas (Lambert et al., 2001; Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

Em células bacterianas, a alteração da permeabilidade da membrana provoca a perda de íons e a redução do potencial da membrana, colapso da força próton motiva e depredação do pool de ATP (Ultee et al., 2002; Di Pasqua et al., 2006). Alterando a permeabilidade da parede celular e da membrana plasmática, permite-se a saída de íons e do conteúdo celular, o que modifica o equilíbrio celular, podendo levar à liberação de macromoléculas e à lise celular (Cox et al., 2000; Lambert et al., 2001; Oussalah et al., 2006).

Óleos essenciais ainda são capazes de causar coagulação do citoplasma, danificar lipídios e proteínas e afetar a atividade geral da célula, como controle da pressão de turgor, transporte de solutos e regulação do metabolismo, como síntese de RNA, DNA, proteínas e polissacarídeos (Ultee et al., 2002; Burt, 2004; Lanciotti et al., 2004).

Estudos de Barbel & Yashphe (1989), citados por Lima (2008), avaliando o efeito do óleo essencial de *Achillea fragmentissima* em *Escherichia coli*, inferiram que o óleo atua na membrana bacteriana, promovendo a inibição da respiração celular, reduzindo o conteúdo de ATP, além de facilitar a liberação de polipeptídeos e íons K⁺ para o meio.

A atividade antimicrobiana de diversos óleos foi avaliada *in vitro* diante de diferentes espécies de micro-organismos. Chao et al. (2000), avaliando o efeito de 45 óleos essenciais sobre oito bactérias (quatro Gram-positivas e quatro Gram negativas), dois fungos e leveduras, constataram que todos os óleos apresentaram inibição em relação aos controles; porém, os óleos que apresentaram altas propriedades antimicrobianas e a maior gama de inibição foram os obtidos da casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim-limão da Índia Oriental (*Cymbopogon flexuosus*), segurelha (*Satureja montana*), camomila-romana (*Chamaemelum nobile*), pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), hortelã (*Mentha spicata*) e chá-árvore (*Melaleuca alternifolia*).

Pereira et al. (2008) constaram em testes *in vitro* que os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) promoveram inibição no crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8739. Anteriormente, Freire (2008), pesquisando cepas das bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25992 observou a atividade inibitória dos óleos essenciais de anis-estrelado (*Illicium verum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e manjerona (*Origanum manjorona*) sobre o crescimento das bactérias em estudo.

Scherer et al. (2009), avaliando a ação antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), citronela (*Cymbopogon winterianus*) e palmarosa (*Cymbopogon martinii*) sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*

Thyphimurium, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*, verificaram que as amostras de cravo-da-índia, citronela e palmarosa, apresentaram ação antimicrobiana, variando de moderada a forte.

Singh et al. (2008), estudando as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *Zingiber officinale* para diversas espécies bacterianas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Klebsiella pneumoniae*, observaram que o óleo essencial apresentou efeito inibitório de bom a moderado para todas as bactérias testadas.

No que diz respeito à atividade antimicrobiana *in vivo*, em pesquisas recentes tem sido demonstrado a possível utilização como conservantes naturais em alimentos e como soluções sanificantes na remoção de biofilmes bacterianos. Tebaldi (2008) comprovou a atividade biocida das soluções detergentes sanificante de *S. aromaticum* e *S. officinalis* preparadas em NaOH 1% sobre biofilmes formados por *P. aeruginosa*, podendo seu uso constituir mais um importante método de controle desse micro-organismo. Pesquisas de Bussata et al. (2007) avaliando a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* em linguiça fresca, verificaram que a adição desse à linguiça pode ser uma alternativa promissora, pois observaram efeitos bacteriostáticos do óleo diante de *Escherichia coli* em concentrações inferiores a concentração mínima inibitória (CMI).

2.6 Bactérias patogênicas encontradas em alimentos

Os alimentos são excelentes substratos para o desenvolvimento de numerosas espécies e variedades de micro-organismos, por vários fatores ambientais. Esses micro-organismos podem ser originários de diversas fontes, como solo, ar, água, manipuladores, trato intestinal de seres humanos e de outros animais, matérias-primas, equipamentos e utensílios (Forsythe, 2005).

A presença de micro-organismos em alimentos tem como consequência importante a ocorrência de doenças denominadas Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). O Ministério da Saúde, na RDC nº12/2001, define DTA como uma síndrome originada pela ingestão de alimentos e/ou de água que contém agentes etiológicos (biológicos, toxinas, físicos ou substâncias químicas) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor em nível individual ou grupo de população (Brasil, 2001; Ridel, 2005).

As DTAs são comuns em nosso país e vêm se tornando a principal preocupação, do ponto de vista de segurança alimentar, entre consumidores e agências reguladoras. Muito embora a maioria dos casos seja considerada como leves e moderados, algumas infecções mais graves podem causar sequelas e até mesmo óbitos, além dos gastos hospitalares, do afastamento de atividades profissionais e escolares. (Lira, 2005; Ridel, 2005).

Os micro-organismos causadores de DTAs são divididos em dois tipos: infecciosos e intoxicantes. O primeiro grupo compreende aqueles que se multiplicam no trato intestinal humano, enquanto o segundo grupo é formado por aqueles que produzem toxinas, tanto nos alimentos como durante a sua passagem no trato intestinal. Assim, para que uma infecção de origem alimentar ocorra, é necessário que o micro-organismo esteja viável para provocar a doença; em contrapartida, em toxinoses de origem alimentar, a presença do micro-organismo viável não é estritamente necessária, pois a toxina pode ser pré-formada no alimento (Forsythe, 2005; Jay, 2005).

As bactérias são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos, pois atuam sob numerosos tipos de substratos, sob diferentes faixas de temperatura e de pH, bem como de condições do meio ambiente. Elas são agentes importantes na etiologia das DTAs de origem microbiana, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja como causadoras de infecções ou toxinoses (Sousa, 2003; Jay,

2005). Entre as bactérias patogênicas que podem vir a ocasionar DTAs, têm-se como alguns exemplos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies do gênero *Salmonella* (Forsythe, 2005; Jay, 2005; Silva et al., 2005).

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. Apresentam-se em forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, isoladas ou agrupadas em cachos. São imóveis, anaeróbias facultativas, não esporulados e suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro. As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie. (Jay, 2005; Kanafania & Fowler Junior, 2006).

Os estafilococos são bactérias oportunistas, vastamente distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. Os *Staphylococcus* são divididos em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa (Andrade, 2008).

O *Staphylococcus aureus* é um organismo coagulase positivo, oxidase negativo e aeróbico facultativo; pode crescer em uma ampla margem de temperatura, tendo como limite mínimo e máximo 7°C e 49°C e a produção de toxinas ocorre na faixa de 10°C – 48°C, mas sua faixa ótima de sua produção é de 40°C - 45°C (Baird-Parker, 1990; Tortora, 2000).

S. aureus é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e em narinas de 20-40% dos adultos, ao passo que 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente o que aumenta os riscos de contaminação dos alimentos manipulados, sendo os produtos lácteos são os principais substratos alimentícios para esse micro-organismo (Bania et al., 2006).

Devido a sua capacidade de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano, está associado a altas taxas de mortalidade e morbidade. É capaz de adquirir resistência a antibióticos e de sobreviver em diferentes condições ambientais, o que o torna um perigoso agente infeccioso no ambiente hospitalar. Considerando o cenário epidemiológico mundial, este micro-organismo é considerado a terceira causa mais relevante de DTAs. (Saginur & Suh, 2008). Esse micro-organismo pode produzir diversas toxinas, que são responsáveis pela sua patogenicidade. São classificadas em exo e endotoxinas, sendo as principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos as enterotoxinas, que são as responsáveis pelas toxinoses e as maiores causadoras de surtos de toxinfecção durante diferentes etapas do processamento dos alimentos. As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência de intoxicação. (Casey et al., 2007).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, tornando-se um risco para a saúde pública. O período de incubação da doença pode variar de 30 minutos até 8 horas; porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado. (Stamford et al., 2006; Fisher et al., 2007).

2.6.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli são bacilos Gram-negativos com diâmetro de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, não esporulados, aeróbicos ou anaeróbico facultativos, capazes de fermentar a glicose, produzindo ácido e gás. São imóveis, porém alguns têm a capacidade de mobilidade, pois possuem flagelos peritricos. Podem crescer entre pH de 4,4 a 9, mas são conhecidos pela sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, que lhes permitem

sobreviver no trato intestinal (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2000; Jay, 2005).

A *Escherichia coli* inclui cepas não patogênicas que têm como habitat o trato entérico de humanos e animais saudáveis, e cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. A presença de cepas não patogênicas em alimentos e água indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerada o indicador clássico da possível presença de micro-organismos patogênicos (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2000; Tortora, 2000; Jay, 2005).

Segundo Kuhnert et al. (2000), os patótipos de *E. coli* têm sido classificados como patogênicos de origem entérico e patogênicos extraintestinais. O primeiro grupo é causador de diarreias em humanos e animais e o segundo causa infecções do trato urinário e inflamação generalizada causada por infecção e meningites.

As linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são divididas em seis classes, de acordo com os fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas: EPEC (enteropatogênia clássica); EIEC (enteroinvasora); ETEC (enterotoxigênica); EHEC (entero-hemorrágica), DAEC (difusamente adesiva) e EAaggEC (enteroagregativa) (Nataro & Kaper, 1998).

Pelo o fato de o gado bovino apresentar-se como um portador assintomático de *E. coli* patogênica, pode-se explicar a incidência destas cepas em alimentos elaborados à base de carne, leite não pasteurizado e derivados, e em vegetais crus e minimamente processados. O leite e derivados podem sofrer contaminação direta ou indireta por esse micro-organismo (Heuvelink et al., 1998; Centers for Disease Control and Prevention, 2000; Islam et al., 2005).

2.6.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes apresenta-se na forma de bastonetes curtos Gram-positivos, sendo não formadora de esporos, móveis (com flagelos peritríquios), catalase positiva, oxidase negativa, halotolerantes, desprovida de cápsula. É amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada do solo e fezes de humanos e de outros animais (Adams & Moss, 2004; Jay, 2005).

Apesar de ser frequentemente encontrada em alimentos crus de origem vegetal e animal, *L. monocytogenes* também pode ser isolada de alimentos cozidos devido à contaminação durante o processo industrial. Possui a capacidade de se multiplicar durante a estocagem sob refrigeração. Entre os principais alimentos associados à listeriose de origem alimentar, estão o leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, carnes e derivados, aves, peixes e frutos do mar (Farber & Peterkin, 1991).

A listeriose é uma doença de origem alimentar atípica, devido à alta gravidade, de natureza não entérica e longo período de duração. Adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, pode vir afetar principalmente indivíduos imunodeprimidos, gestantes e recém-nascidos. Manifesta-se por gastroenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante para o feto e septicemias, resultando na morte de 25 a 30% dos casos (Loguercio et al., 2001; Khelef et al., 2005).

2.6.4 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* está amplamente difundido na água e no solo. É um gênero de micro-organismos que compreende mais de 100 espécies, sendo a de maior importância a *Pseudomonas aeruginosa*, por se tratar de um patógeno secundário e oportunista, com grande capacidade invasiva e toxigênica, podendo causar várias doenças.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa, reta ou ligeiramente curva, não fermentadora, obrigatoriamente aeróbica e móvel por flagelos polares, oxidase e catalase positivas, que crescem a 37°C e a 42°C e possuem o metabolismo oxidativo, tolera valores de pH relativamente altos e são capazes de sobreviver em substratos com pequenas quantidades de nutrientes. É uma bactéria que pode ser isolada do solo, água, plantas e mesmo animais, incluindo os seres humanos. (Gales et al., 2001; Trabulsi, 2002).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* tem sido a responsável pela maioria dos casos de doença infecciosa no homem, como: infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, idosos e crianças (Mallet, 2007).

2.6.5 *Salmonella Choleraesuis*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e se apresenta na forma de bacilos, medindo de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. O organismo apresenta crescimento ótimo a 37°C, mas já foram observados crescimentos em temperaturas entre 5 e 45°C, sendo o pH 7 ideal, podendo variar entre 4 e 9, e produz gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*), sendo capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria das cepas são móveis, apresentando na sua estrutura flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullorum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis (Franco & Landgraf, 1996).

De acordo com o Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella*, da Organização Mundial da Saúde (Instituto Pasteur, Paris), o gênero apresenta duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem atualmente 2.519 e 22 sorotipos, respectivamente. (Popoff et al., 2004).

Salmonella enterica é subdivida em seis subespécies, sendo a subespécie *enterica* é a que apresenta a maioria dos mais de 2.500 sorovares identificados e a que compreende os sorogrupos A a H. Cepas dos sorogrupos A, B, C1, C2, D e E causam aproximadamente 99% das infecções em humanos e animais de sangue quente. A *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis são os sorotipos predominantes em salmonelose humana (Fernandes et al., 2006).

As salmonelas podem causar um amplo espectro de doenças em humanos, variando de febre tifoide, bacteremia, gastrinterite e infecções fecais. É uma das principais causas de gastrinterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (Payment & Riley, 2002).

A *Salmonella enterica* causa gastrinterite, diarreia, dores abdominais, náusea, febre, calafrios e dores de cabeça. A febre tifoide é a mais grave de todas as doenças causadas por salmonelas, incluindo *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *C*. (Kaku et al., 1995; Jay, 2005).

Contudo, *Salmonella bongori* e as outras subespécies de *Salmonella enterica* são raramente isoladas de humanos, sendo geralmente isoladas de animais de sangue frio e do ambiente (Farmer et al., 1984 apud Maldonado, 2008).

A *Salmonella Cholerasuis* é uma *Salmonella enterica* sorovar *Cholerasuis*, que faz parte dos sorovares adaptados ao hospedeiro, nesse caso, a suínos. Essa espécie tem propensão de invadir a corrente sanguínea (bacteremia), causando febre alta e persistente, dor no tórax, calafrios, sudorese e vômito, e o estado pode ser passageiro ou crônico (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996; Gray et al., 1996).

2.7 Canela-da-índia (*Cinnamomum zeylanicum*)

Nativa da Ásia, pertencente à família Lauraceae, a *Cinnamomum zeylanicum* (sinônimo *Cinnamomum verum*) é uma árvore perene, com aproximadamente 12-17 m de altura. É encontrada e conhecida no Brasil como canela-da-índia e canela-do-ceilão. As folhas de coloração verde-escuras possuem um formato oval-longo com 7-18 cm de comprimento. As flores são amarelas e pequenas, transformando-se em uma fruta arroxeada, com aproximadamente 1cm, produzindo uma única semente (Figura 8) (Koketsu et al., 1997; Lima et al., 2005).



FIGURA 8 Aspecto geral da espécie canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

A parte comercial da canela constitui-se da parte interna da casca do tronco e dos ramos, que é amplamente utilizada, com vasto uso mundial na perfumaria e na culinária. Seu consumo como especiaria está relacionado às suas propriedades organolépticas (sabor e aroma), que são conferidas pela presença de compostos químicos, como o aldeído cinâmico, o eugenol, a cânfora e uma variedade de polifenóis. É muito difundida na culinária ocidental, nas indústrias de flavorizante, de perfumaria, de bebidas e de alimentos (Lima et al., 2005).

Muitas propriedades biológicas têm sido estudadas e atribuídas à canela, como antioxidantes (Jayaprakasha et al., 2003; Mathew & Abraham, 2006), antimicrobianas (Chao et al., 2000; Jham et al., 2005; Matan et al., 2006; Freire, 2008; Singh et al., 2007), anti-hipertensiva (Agra et al., 2007) e muitos estudos passaram a relatar o possível efeito hipoglicemiante dos compostos fenólicos dessa planta (Subash Babua et al., 2007; Cao et al., 2007).

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 (Grossman, 2005).

Koketsu et al. (1997) encontraram no óleo essencial da casca 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%). Freire (2008) encontrou, no óleo essencial da casca, aldeído cinâmico na proporção de 87,70%, seguido de β e α -pineno.

2.8 Gengibre (*Zingiber officinale*)

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta asiática, da família das Zingiberaceae, herbácea, rizomatosa, perene, possui raízes adventícias e folhas dísticas, sendo as basilares reduzidas, brácteas florais obovadas, cada uma envolvendo uma só flor (Figura 9). Os rizomas possuem aroma e sabor suavemente canforáceo; é cultivada no Brasil com propósito medicinal e ocasionalmente como ornamental (Lorenzi & Matos, 2002).

O gengibre é amplamente empregado na medicina tradicional, há muitos séculos, para aliviar sintomas como inflamação, doenças reumáticas e desconfortos gastrintestinais (Pfeiffer et al., 2006). Seus extratos e seus principais compostos pungentes, os gingeróis, têm mostrado recentemente variada atividade biológica, incluindo, entre outros, o efeito como agentes

antineoplásicos (Jiang et al., 2005), antiespasmódicos e antieméticos (Afazal et al., 2001), inibidores de enzimas (Tjendraputra et al., 2001), antimicrobianos (Singh et al., 2008; Soares, 2009), anti-inflamatórios, antioxidantes (Habsah et al., 2000; Thomson et al., 2002; Jiang et al., 2005; Singh et al., 2008).

De acordo com Sacchetti (2004), o óleo essencial de gengibre tem sido usado como parte dos ingredientes de alimentos (sabor), bebidas (sabor), higiene e cosméticos (Aroma) devido ao seu potencial antimicrobiano.

Segundo ICMR Buletin (2003), o teor médio de óleo essencial nos rizomas de gengibre varia de 1 a 3%, sendo relatada a presença dos seguintes constituintes: 1,8-cineol, acetato de geranila, acetato de zingiberol, β -bisaboleno, β -felandreno, borneol, canfeno, caprilatos de zingiberol, chugaóis, citral, canfeno, falandreno, gingediol, gingeróis, linalol, zingiberol, zingibereno.



FIGURA 9 Aspecto geral da espécie gengibre (*Zingiber officinale*)

2.9 Capim-citronela (*Cymbopogon nardus*)

O capim-citronela (*Cymbopogon nardus*) é pertencente à família Poaceae, originária do Ceilão e sul da Índia. No Brasil, é conhecida como citronela, citronela-do-ceilão, lenabatu-grass e cidró-do-paraguai. É uma erva perene, cespitosa, de 0,80-1,20 m de altura. As folhas são planas, inteiras, estreitas, longas, de 0,5-1 m de altura, com margens ásperas, ápice agudo, face superior verde-escura-brilhante e inferior verde-oliva-grisácea. Apresentam

aspecto curvo, sendo intensamente aromáticas, lembrando o eucálio citriodora (Figura 10) (Castro & Ramos, 2003).

É uma planta muito utilizada para fins de perfumaria, com o intuito de afastar insetos do lar e de grãos armazenados, como desinfetante do lar e bactericida laboratorial e como matéria-prima para síntese de outros aromas (Castro & Ramos, 2003).

Essa planta medicinal e aromática tem crescido em importância no Brasil devido à grande procura pelo seu óleo essencial, tanto no mercado interno, quanto para exportação (Rocha et al., 2000). O óleo extraído de suas folhas é rico em citronelal (aproximadamente 40%) e tem pequenas quantidades de geraniol, citronelol e ésteres. O citronelol é excelente aromatizante de ambientes e repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana local e acaricida (Mattos et al., 2000).

Mahalwal & Ali (2002), avaliando a composição química do óleo essencial de folhas secas do capim-citronela (*Cymbopogon nardus*), observaram que o óleo essencial continha 35 componentes, dos quais 29 compunham 92,7% do óleo e foram totalmente identificados. O óleo continha 16 monoterpenos (79,8%), nove sesquiterpenos (11,5%) e quatro compostos não terpênicos (1,4%). Os componentes majoritários encontrados foram citronelal (29,7%), geraniol (24,2%), γ -terpineol (9,2%) e cis-sabineno hidratado (3,8%), (*E*)-nerolidol (4,8%), β -cariofileno (2,2%) e germacren-4-ol (1,5%).



FIGURA 10 Aspecto geral da espécie capim-citronela (*Cymbopogon nardus*)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As plantas, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*, foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Lavras-MG, Brasil, e *Cymbopogon nardus* foi coletada no Horto de Plantas Medicinais da UFLA, no dia 3 de março de 2009, às 8 horas da manhã, um dia ameno e sem precipitação. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil), 21°14'S, longitude 45°00'W Gr. e 918 m de altitude. As partes utilizadas das plantas foram cascas do tronco secas de *C. zeylanicum*, rizomas de *Z. officinale* e folhas frescas de *C. nardus*.

3.2 Extração do óleo essencial

As extrações foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras. O método de extração foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (Guimarães et al., 2008). Foram feitas três repetições de cada uma, destilando-se por 2 horas. Decorrido esse tempo, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 965,36 x G por 5 min. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenado em freezer.

3.2.1 Determinação da umidade

Paralelamente às extrações, realizou-se o teste de umidade, de acordo com Pimentel et al. (2006). Utilizaram-se 5g de material vegetal imersos em 80 mL de ciclohexano em balão volumétrico com capacidade de 250 mL, o qual foi acoplado a um condensador com coletor volumetricamente graduado. O aquecimento do balão foi realizado por meio de manta aquecedora. Após 2,5

horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com Base Livre de Umidade (% p/p BLU).

3.3 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM - Shimadzu, modelo QP 5050A), na Universidade Federal de Sergipe, sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase ligada DB5 (0,25µm de espessura de filme); He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min, a temperatura foi programada mantendo 50°C por 1,5 min, seguindo de um aumento de 4°C/min até atingir 200°C, depois a 10°C, até atingir 250°C, mantendo-se constante essa temperatura por 5 min.; temperatura do injetor: 250°C e temperatura do detector (ou interface) de 280°C; o volume da amostra injetada foi de 0,5µL em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 64.20 kPa. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmento e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (Adams, 2007), Para o índice de retenção, foi utilizando a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação à série homóloga de n-alcenos (nC_8 - nC_{18}) e fazendo extrapolação para C_{19} e C_{20} . Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes na bibliotecas.

A análise quantitativa foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu CG – 17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas seguintes condições experimentais: coluna capilar DB5; programação da coluna:

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

3.4. Atividade biológica dos óleos essenciais

A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

3.4.1. Manutenção e ativação das culturas bacterianas

Durante o experimento, os micro-organismos foram mantidos, em eppendorfs contendo meio de congelamento, sob refrigeração (4°C) (Tebaldi, 2008).

Para ativação das culturas, as cepas foram repicadas em caldo-infusão de cérebro e coração (BHI), e ficaram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a ativação, foram realizados os plaqueamentos em meios específicos para cada espécie.

3.4.2. Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias

3.4.2.1. Teste de Difusão Cavidade em Ágar

As bactérias foram repicadas em caldo BHI, e ficaram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas desse meio foram transferidas para um tubo com 5 mL de caldo de soja triptica (TSB). Os tubos foram incubados a

37°C, até alcançar a turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo 10^8 UFC.mL⁻¹. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm (National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2003).

A concentração de inóculo obtida pela escala McFarland de 0,5 (10^8 UFC.mL⁻¹) foi diluída até atingir a concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹, sendo, em seguida, transferida para o meio de cultura TSA, para as espécies *Listeria monocytogenes*, e para as demais espécies, transferida para o Ágar Mueller-Hinton. O ágar no qual foi inoculada a cultura bacteriana foi depositado sobre uma camada do mesmo ágar onde foram feitos os poços de deposição do óleo com o auxílio de pérolas de vidro. Esses foram preenchidos com 10 µL das concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90, 1,95 e 0 µg.mL⁻¹) do óleo essencial diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram incubadas em BOD 37°C por 24 horas e medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 µL de DMSO; como padrão de comparação, utilizou-se uma solução de 100 µg.mL⁻¹ do antibiótico Cloranfenicol (CL) (Ogunwande et al., 2005).

A partir dos diâmetros obtidos, que evidenciaram a sensibilidade do micro-organismo, pode-se avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias em diferentes concentrações dos óleos essenciais. A concentração inibitória mínima (CMI) foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a presença de halo de inibição.

3.4.3 Análise estatística

O delineamento de blocos inteiramente casualizados (DIC) foi feito com o esquema fatorial de 5x 3 x 10 (bactérias x óleo essencial x concentrações),

com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (Ferreira, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5. Atividade antioxidante

3.5.1 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 μ L de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20 e 75 μ L de uma solução clorofórmica de β -caroteno á 2 mg.mL⁻¹. Eles foram dissolvidos em 1,5 mL de clorofórmio que, posteriormente, foi retirado utilizando rota-evaporador (Büchi Rotavapor R114) a 50°C. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com 150 mL de água destilada oxigenada sob vigorosa agitação.

Alíquotas de 2,8 mL dessa emulsão foram transferidas para tubos de ensaio e, em seguida, foram adicionadas 0,2 mL das diluições do óleo essencial em metanol, atingindo as seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 100 e 200 μ g.mL⁻¹, sendo o controle composto apenas de metanol. A absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) a 470 nm.

Os tubos foram incubados a 50°C para a reação de oxidação e a leitura da absorbância foi medida em um intervalo de 60 minutos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

De acordo com Kulisic et al. (2004), a atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição após 60 minutos de incubação utilizando a equação 1 :

$$AA = 100. (Dr_c - Dr_s)/Dr_c$$

Em que:

AA = Porcentagem de inibição;

Dr_c = Razão de degradação do controle $[(\ln(a/b))/60]$;

Dr_s = Razão de degradação na presença da amostra $[(\ln(a/b))/60]$;

a = Absorbância no tempo zero;

b = Absorbância no tempo 60 minutos.

Para a obtenção da CI_{50} , foram plotados gráficos como os valores de %I da degradação do β -caroteno *versus* as concentrações analisadas.

Para fins de comparação, foram testados os padrões timol e ácido ascórbico, por já possuírem atividade antioxidante reconhecida. A curva analítica foi construída utilizando as mesmas concentrações dos óleos essenciais.

3.5.1.1 Análise estatística

O delineamento de blocos inteiramente casualizados (DIC) foi feito com o esquema fatorial de 2 x 3 x 6 (padrões x óleo essencial x concentrações), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (Ferreira, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5.2. Método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH na concentração de 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações (500; 300; 100; 50; 25; 10; 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução-estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL da solução de óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco, contendo todos os reagentes, com exceção do óleo essencial. Após 60 minutos, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) no

comprimento de onda de 515 nm (Tepe et al., 2005). A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de DPPH inibido, empregando a equação 2:

$$\%I = 100 - [(DPPH_{am}/DPPH_{bran})/100]$$

Em que:

DPPH_{am}: concentração de DPPH na concentração da amostra analisada;

DPPH_{bran}: concentração de DPPH do branco.

Para a obtenção da CI₅₀, foram plotados gráficos como os valores de %I do DPPH *versus* as concentrações analisadas.

Para fins de comparação, foram testados os padrões timol, ácido ascórbico, por já possuírem atividade antioxidante reconhecida. A curva analítica foi construída utilizando as concentrações 50; 25; 10; 5; 2,5; 1 µg.mL⁻¹ para o ácido ascórbico e, para o timol utilizaram-se as mesmas concentrações dos óleos essenciais.

3.5.2.1 Análise estatística

O delineamento de blocos inteiramente casualizados (DIC) foi feito com o esquema fatorial de 2 x 3 x 7 (padrões x óleo essencial x concentrações), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (Ferreira, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento

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

TABELA 1 Rendimentos dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*

Planta	Massa (g)	Umidade (%)	Óleo essencial (% p/p BLU)
<i>C. nardus</i> (Citronela)	300	65,33	2,43
<i>C. zeylanicum</i> (Canela)	500	8,67	0,43
<i>Z. officinale</i> (Gengibre)	960	78,00	0,46

* BLU – Base livre de umidade.

Pelos dados da Tabela 1, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais foram de 2,43% para as folhas de capim-citronela, 0,43% para cascas do tronco de canela e 0,46% para os rizomas de gengibre. Castro et al. (2007), pesquisando o óleo essencial de capim-citronela, encontraram 1,15% de rendimento, valor muito inferior ao encontrado nesse estudo. De acordo com Blank et al. (2007), mudanças sazonais apresentaram efeito significativo sobre o rendimento dos óleos essenciais e, no caso do capim-citronela, foi observado um rendimento máximo de seu óleo essencial às 9 horas durante o verão, inverno e primavera.

Koketsu et al. (1997) obtiveram 0,27% de rendimento do óleo essencial de canela, valor inferior ao encontrado neste estudo. Contudo, Freire (2008), estudando a mesma espécie, obteve um rendimento de 0,7%, valor superior ao deste trabalho, e 7% de umidade. Dados da literatura mostram que o rendimento de óleo essencial de *C. zeylanicum* varia de 0,2 a 2,0% nas cascas e de 0,7 a 1,2% nas folhas (Guenther, 1950; Purseglove et al., 1981).

Pesquisadores avaliando a eficiência de diversos processos com base nos rendimentos do óleo essencial de gengibre, encontram 1,9% de óleo essencial em base seca, valor muito superior ao encontrado neste trabalho; porém, ambos os resultados compreendem a faixa de valores reportados na literatura que oscilam entre 0,2 e 2,7% (Pereira et al., 2007). Em relação à umidade, os mesmos autores observaram que os rizomas *in natura* de gengibre continham, em média, 87% de umidade, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

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.

4.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

4.2.1 *Cymbopogon nardus* (Capim-citronela)

Pelos dados descritos na Tabela 2, observa-se que foram identificados 17 constituintes presentes no óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, sendo os componentes majoritários os monoterpenos acíclicos, citronelal (47,12%), geraniol (18,56%) e citronelol (11,07%) (Figura 11).

Oliveira et al. (2010), estudando o óleo essencial de *C. nardus*, encontraram, como componentes majoritários, citronelal (34,60%), geraniol (23,17%) e citronelol (12,09%), corroborando com os dados deste trabalho; porém, os constituintes minoritários, como o β -elemeno, δ -cadineno, α -muuroleno e neo-isopulegol não foram encontrados neste estudo. Anteriormente, Malele et al. (2007), avaliando a composição do óleo essencial de capim-citronela encontraram resultados diferentes daqueles encontrados neste estudo. Observaram a presença de linalol (27,4%), citronelol (10,9%), geraniol (8,5%), cis-calameneno (4,3%), β -elemeno (3,9%), entre outros compostos. Como citado anteriormente, a composição e a concentração dos componentes dos óleos

essenciais de plantas de mesma espécie podem variar devido a fatores ecológicos e as condições edafoclimáticas. De acordo com Marco et al. (2007), os componentes do óleo essencial de citronela são afetados pela época de coleta e espaçamento entre as plantas. Seus resultados mostram que o teor de geraniol foi superior em plantas colhidas quatro meses após o plantio; porém, não houve influência do espaçamento e de altura de corte sobre ele, concordando, assim, com os resultados obtidos por Blank et al. (2007), que reportaram que os componentes do óleo essencial de citronela foram alterados conforme a estação do ano e secagem, mas não variaram pelo horário de colheita.

TABELA 2 Composição química do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon nardus*

	Compostos	TR	IKt	IKc	%
1	Limoneno	8,133	1029	1031	2,88
2	Linalol	10,707	1095	1102	0,71
3	Isopulegol	12,584	1149	1152	0,96
4	Citronelal	12,979	1153	1158	47,12
5	Citronelol	16,185	1125	1230	11,07
6	Geraniol	17,375	1252	1255	18,56
7	Geranial	17,977	1267	1271	0,75
8	Acetato de citronelila	21,671	1352	1350	1,56
9	Eugenol	21,789	1359	1357	0,69
10	Acetato de geranila	22,996	1381	1379	2,59
11	B-elemenol	23,395	1390	1392	0,80
12	Germancreno D	27,192	1485	1486	1,14
13	δ -cadineno	28,966	1523	1522	0,92
14	Elemol	30,016	1549	1554	4,04
15	Germancreno D-4-ol	31,084	1575	1583	0,96
16	Epi- α -muurolol	33,713	1642	1651	0,74
17	7-epi- α -eudesmol	34,214	1663	1663	1,64
Total identificado					97,13%

*TR= tempo de retenção (minutos), IKt = índice de Kovats tabelado (Adams, 2007), IKc = índice de Kovats calculado, %= porcentagem do componente.

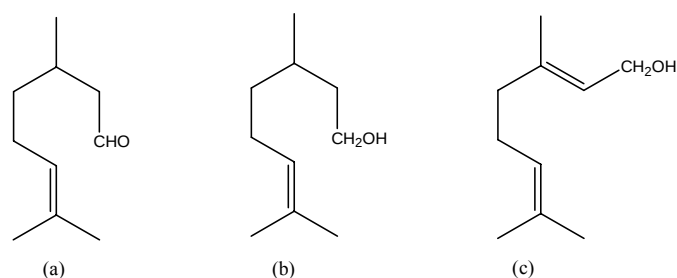


FIGURA 11 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Cymbopogon nardus*. (a) Citronelal, (b) Citronelol e (c) Geraniol.

4.2.2 *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)

No óleo essencial da casca seca de *Cinnamomum zeylanicum*, foram identificados 14 constituintes (Tabela 3), sendo os fenilpropanóides (E)-cinamaldeído (77,72%), acetato de (E)-cinamila (5,99%) e o monoterpenoide 1,8-cineol (4,66%) (Figura 12) encontrados como componentes majoritários.

Pesquisas de Singh et al. (2007) com *C. zeylanicum* verificaram a presença de 13 componentes no seu óleo essencial, sendo o (E)-cinamaldeído (97,7%) encontrado como o principal componente, seguido do δ -cadineno (0,9%), α -copaeno e (0,8%) e α -amorfeno (0,5%). Posteriormente, Freire (2008), estudando a composição do óleo essencial da casca seca de canela encontrou apenas três compostos, aldeído cinâmico (87,70%), α -pineno (7,98%) e β -pineno (4,23%). Esses dados concordam com os obtidos neste estudo em relação ao elevado teor de (E)-cinamaldeído na composição do óleo essencial das cascas de canela.

Em estudos realizados com outras partes da planta, Lima et al. (2005) encontraram 23 constituintes no óleo essencial das folhas de canela, dos quais o eugenol apresentou-se como o componente majoritário (60%). No óleo essencial dos galhos, foram identificados 36 compostos, com predominância dos monoterpenos α - e β -pineno (9,9%; 3,5%), α -felandreno (9,2%), p-cimeno

(6,2%), limoneno (7,9%), linalol (10,6%); dos sesquiterpenos α -copaeno (3,3%), (β)-cariofileno (6,7%), óxido de cariofileno (3,1%) e dos alilbenzenos (E)-cinamaldeído (7,8%) e acetato de (E)-cinamila (9,7%). Anteriormente, Jayaprakasha et al. (2003), avaliando a composição do óleo essencial dos galhos, verificaram a presença de hidrocarbonetos (44,7%) e compostos oxigenados (52,6%). Esses pesquisadores identificaram 27 compostos que constituem 95,98% do óleo essencial, sendo o acetato de (E)-cinamila (36,59%) e (E)-cariofileno (22,36%) os compostos majoritários. Esses estudos comprovam que a parte da planta escolhida tem grande importância no que se refere ao teor e composição do óleo essencial.

TABELA 3 Composição química do óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum*

	Compostos	TR	IKt	IKc	%
1	α -pineno	5,365	933	939	2,03
2	Canfeno	5,747	954	950	1,13
3	Benzaldeído	5,974	960	965	0,51
4	β -pineno	6,508	979	979	0,91
5	Limoneno	8,107	1029	1031	0,77
6	1,8-cineol	8,201	1031	1035	4,66
7	Linalol	13,174	1095	1101	0,99
8	Borneol	13,402	1169	1178	0,70
9	Terpinen-4-ol	13,895	1177	1184	1,18
10	α -terpineol	14,464	1188	1199	1,73
11	(Z)- Cinamaldeído	15,640	1219	1225	0,57
12	(E)- Cinamaldeído	18,159	1270	1288	77,72
13	Acetato de bornila	18,702	1288	1290	1,11
14	Acetato de (E)-cinamila	25,560	1446	1451	5,99
Total identificado					100%

* TR= tempo de retenção (minutos), IKt = índice de Kovats tabelado (Adams, 2007), IKc = índice de Kovats calculado, %= porcentagem do componente.

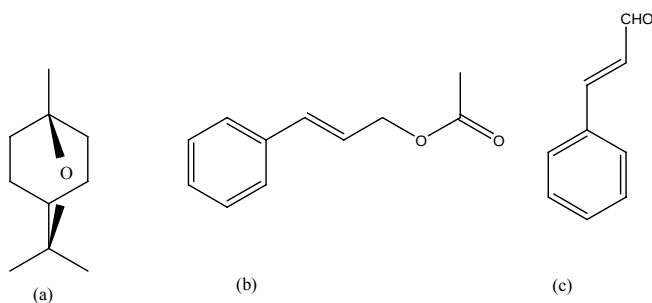


FIGURA 12 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*. (a) 1,8-Cineol, (b) Acetato de (E)-cinamila e (c) Aldeído cinâmico.

4.2.3 *Zingiber officinale* (Gengibre)

Na Tabela 4, estão descritos os constituintes encontrados no óleo essencial de *Zingiber officinale*, sendo os compostos majoritários os monoterpenos oxigenados, geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geranila (4,19%) e o monoterpeneo bicíclico, canfeno (4,30%) (Figura 13).

Foram identificados 57 compostos no óleo essencial de gengibre por Singh et al. (2008), representando 92,7% da composição total do óleo, sendo geranial (25,9%), α -zingibereno (9,5%), (E,E)- α -farneseno (7,6%), neral (7,6%) e ar-curcumeno (6,6%) encontrados como componentes majoritários. Esses dados corroboram com aqueles encontrados neste trabalho para os compostos majoritários (geranial e neral); porém, os demais constituintes foram diferentes.

Soares (2009), em seus estudos relacionados à composição do óleo essencial de gengibre, encontrou como compostos majoritários geranial (20,92%), nerol (14,34%), sabineno (9,08%), α -zingibereno (8,04%), resultados diferentes ao deste estudo, exceto pela presença do geranial. Sacchetti et al. (2004), analisando o óleo essencial de gengibre cultivado na Amazônia

equatorial, observaram a presença de zingibereno (23,9%), β -bisaboleno (11,4%) e β -sesquifelandreno (10,9%) como compostos majoritários, compostos que foram identificados neste estudo, porém, em teores minoritários.

TABELA 4 Composição química do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber officinale*

	Compostos	TR	IKt	IKc	%
1	2-heptanol	4,492	896	902	2,03
2	α - pineno	5,376	939	933	1,30
3	Canfeno	5,765	954	951	4,32
4	β -pineno	6,703	979	979	0,25
5	6-metil-5-hepten-2ona	6,869	985	986	0,65
6	Mirceno	8,146	990	990	1,32
7	1,8-cineol	8,223	1031	1036	10,98
8	2-nonanona	8,519	1090	1093	0,51
9	Linalol	10,698	1098	1102	1,80
10	Citronelal	12,856	1153	1154	0,73
11	Borneol	13,421	1169	1177	1,11
12	(E) Isocitral	14,111	1180	1182	0,49
13	Citronelol	16,163	1225	1232	2,85
14	Neral	16,747	1238	1246	16,47
15	Geraniol	17,345	1252	1258	8,51
16	Geranial	18,107	1267	1277	25,06
17	2-hundecanona	21,664	1294	1295	0,60
18	Acetato de geranila	22,999	1381	1380	4,19
19	Ar-curcumeno	27,234	1480	1483	0,55
20	α -zingibereno	27,801	1493	1497	2,19
21	E-E- α -farneseno	28,340	1505	1505	1,37
22	β -sequifelandreno	28,976	1522	1527	1,07
Total identificado					93,24%

*TR= tempo de retenção (minutos), IKt = índice de Kovats tabelado (Adams, 2007), IK = índice de Kovats calculado, %= porcentagem do componente.

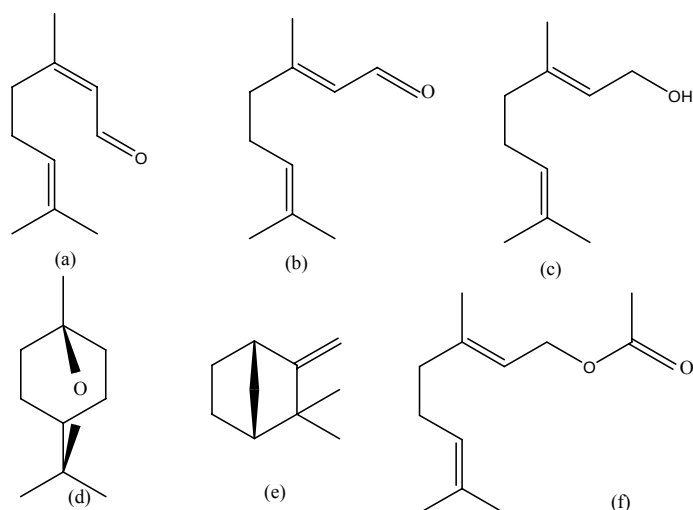


FIGURA 13 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Zingiber officinale*. (a) Neral, (b) Geranial, (c) Geraniol, (d) 1,8-Cineol, (e) Canfeno e (f) Acetato de geranila.

Realizando estudos relacionados com a composição do óleo essencial de dois genótipos diferentes de gengibre, o Paulista e o Japonês, Dabague et al. (2007) encontraram composição similar para ambos os genótipos. No Paulista foi identificado o acetato de geranila (13,99%), geranial (13,87%), zingibereno (10,67%) e β -bisaboleno (7,81%) e, no Japonês, foram encontrados o acetato de geranila (15,95%), geranial (15,66%), zingibereno (10,98%) e β -bisaboleno (8,46%).

4.3 Atividade antibacteriana

Os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos óleos essenciais obtidas no experimento para as bactérias em estudo estão expressas na Tabela 5. Na qual se verifica que os óleos essenciais estudados apresentaram efeito inibitório satisfatório, tanto para bactérias Gram-positivas como bactérias

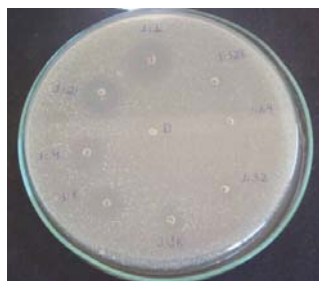
Gram-negativas, sendo as bactérias Gram-negativas as que apresentaram valores de CMI maiores que as Gram-positivas. É possível observar também que entre os micro-organismos testados, a espécie *E. coli* apresentou-se como a mais resistente, pois não foi constatado efeito inibitório dos óleos essenciais de *C. nardus* e *Z. officinale* sobre esse micro-organismo nas concentrações avaliadas.

Sabe-se que, na maioria das vezes, bactérias Gram-negativas são menos sensíveis aos óleos essenciais que bactérias Gram-positivas, pois a parede celular das Gram-negativas é rica em polissacarídeos, o que inibe a penetração das substâncias antimicrobianas (Burt, 2004; Ceylan & Fung, 2004).

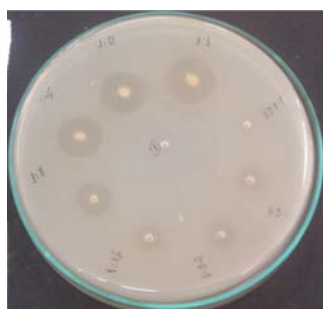
Tabela 5 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* encontrada para os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Cholerasuis*.

Bactéria	Gram	CMI (µg/mL)			DMSO	CL
		<i>C. nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	31,25	7,81	7,81	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	31,25	7,81	15,2	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	NI	15,62	NI	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853	-	250,0	7,81	62,5	NI	100
<i>S. Cholerasuis</i> ATCC 6539	-	125,0	15,62	15,62	NI	100

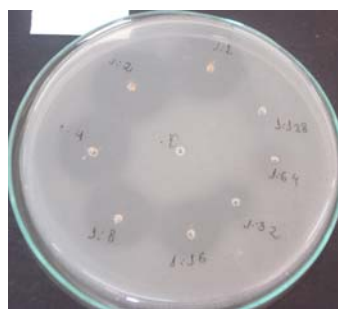
*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

FIGURA 14 Fotografias do último dia de experimento para a avaliação do efeito inibitório do óleo *Cinnamomum zeylanicum* sobre (a) *Escherichia coli*, (b) *Listeria monocytogenes*, (c) *Staphylococcus aureus*, (d) *Pseudomonas aeruginosa* e (e) *Salmonella Cholerasuis*.

A técnica de difusão em ágar é a mais utilizada entre as várias técnicas de determinação de atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Por meio dela

é possível avaliar o grau de inibição do crescimento microbiano. A eficiência do óleo é determinada pelo tamanho da zona de inibição formada na superfície, em volta da cavidade ou disco (Mondello et al., 2003; Kalemba & Kunicka, 2003). Assim, a eficiência do óleo pode ser determinada principalmente pela diferença do tamanho do halo formado.

Apesar de os óleos essenciais apresentarem dificuldade de se difundir uniformemente pelo meio de cultura devido à sua natureza hidrofóbica, a sua alta volatilidade contribui para a formação de halos de inibição, tornando a técnica de difusão em ágar um método válido na determinação da atividade antimicrobiana (Lambert et al., 2001; Inouye et al., 2006).

Entre os óleos essenciais avaliados, o óleo de capim-citronela apresentou-se menos eficiente. Brugnera (2008), avaliando o perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas de alimentos frente ao óleo essencial de capim-citronela, encontrou como CMI $3,91 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *E. coli*, $7,81 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *S. aureus*, $31,25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes* e $3,91 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *P. aeruginosa*. Todos os valores encontrados pelo autor foram inferiores aos encontrados neste estudo. Anteriormente, Oussalah et al. (2006), estudando o efeito antimicrobiano de vários óleos essenciais, observou que o óleo essencial de citronela (Vietnam) apresentou valores de CMI de 8,0; 4,0 e $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* e *S. aureus*, respectivamente. A diferença na atividade antimicrobiana pode ter ocorrido devido às diferenças na composição dos óleos essenciais, no diluente utilizado, na cultura de referência e na concentração de células.

Em relação ao efeito do óleo essencial de gengibre no controle de bactérias patogênicas encontradas em alimentos, Singh et al. (2008), empregando o método de difusão cavidade em ágar, não observou halos de inibição para *E. coli* e *S. aureus*; resultados similares foram encontrados neste estudo para *E. coli*.

Goñi et al. (2009), avaliando o efeito antimicrobiano dos vapores gerados pelo óleo essencial de canela, em testes de difusão de vapor, encontram os seguintes valores de CMI : $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. coli*, $136 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. choleraesuis*, $54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes*, $36 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*, não observando inibição para *P. aeruginosa*. Esses valores são maiores que os encontrados neste trabalho e essa diferença pode ser atribuída à diferença da técnica e à composição da atmosfera que continha 67,12% de eugenol.

De acordo com Dorman et al. (2000), as estruturas químicas dos componentes individuais do óleo essencial afetam seu modo de ação e a atividade antibacteriana. Kalemba & Kunicka (2003), verificaram que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais ocorre da seguinte forma: os fenólicos são mais ativos, seguido de aldeídos, cetonas, álcoois e, finalmente, éteres. Estudos de Velluti et al. (2003) indicam que a atividade antimicrobiana dos compostos hidroxilados dos óleos podem estar relacionadas com as ligações de hidrogênio, que possivelmente interagem com sítios ativos das enzimas bacterianas. Entretanto, o mecanismo de ação dos terpenos não é completamente esclarecido; sabe-se que está relacionado com a ruptura da membrana plasmática, devido ao caráter lipofílico (Cowan, 1999).

Os óleos essenciais de gengibre e capim-citronela mostraram-se ricos em monoterpenoides. Segundo Sikkema et al. (1995), o mecanismo de ação desses envolve principalmente efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular. Como eles são hidrofóbicos, provavelmente deslocam-se da fase aquosa em direção às estruturas da membrana. O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá conferir a ela uma característica de permeabilidade, promovendo a dissipação da força próton motiva, redução do pool de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e a perda de íons como potássio e fosfato. Esses danos na membrana

levam ao comprometimento das suas funções (Sikkema et al., 1994; Bakkali, et al., 2008).

Muitos álcoois terpênicos foram identificados na composição dos óleos essenciais de gengibre e capim-citronela, como citrionelol, geraniol, α -terpineol e o linalol. Dorman et al. (2000) inferem que álcoois agem como desidratantes, solventes e desnaturando proteínas.

Dos óleos em estudo, o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição do crescimento bacteriano e esse resultado pode estar relacionado com a presença do componente majoritário aldeído cinâmico em elevada concentração (77,72%), quando comparada com as outras plantas estudadas. De acordo com Kalemba & Kunicka (2003), aldeídos possuem maior atividade antimicrobiana, quando comparados com álcoois. De acordo com Burt (2004), o mecanismo de ação seria, portanto, semelhante a outros aldeídos, que é normalmente considerado como os danos a lipídios e proteínas, a perturbação da membrana citoplasmática, interrompendo a força próton motiva, o fluxo de elétrons ativos de transporte e de coagulação do conteúdo da célula. Nas pesquisas de Helander et al. (1998), embora o cinamaldeído tenha sido capaz de inibir o crescimento de *E. coli* O157: H7 e *S. typhimurium* em concentrações semelhantes às do carvacrol e timol, ele não desintegrou a membrana externa ou esgotou o pool de ATP intracelular. Acredita-se que o grupo carbonila seja capaz de se ligar às proteínas, impedindo a ação das aminoácido-decarboxilases em *Enterobacter aerogenes* (Wendakoon & Sakaguchi, 1995).

4.4 Atividade Antioxidante

Pelo método β -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais em estudo apresentaram atividade antioxidante, sendo o óleo essencial de *C. nardus* (CI₅₀ 20,65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) o que se apresentou mais eficiente, seguido de *C. zeylanicum* e

Z. officinale. Entre os padrões testados, o timol (CI_{50} 20,80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente que o ácido ascórbico (Tabela 6).

Tabela 6 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* e dos padrões Timol, Ácido ascórbico pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Métodos	β -caroteno/ácido linoleico	DPPH
Componentes	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>C. nardus</i>	20,65	517,40
<i>C. zeylanicum</i>	303,56	NI
<i>Z. officinale</i>	60,32	NI
Timol	20,80	45,43
Ácido Ascórbico	55,72	3,32

* CI_{50} = Concentração de inibição de 50% NI = não apresentou inibição.

O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico, determinando, assim, a atividade do óleo essencial de proteger um substrato lipídico da oxidação. Esse teste simula a oxidação dos componentes da membrana lipídica na presença de antioxidantes no interior das células, e mede também a capacidade de inibir a formação de dienos conjugados de hidroperóxido resultantes da oxidação do ácido linoleico. (Tepe et al., 2005).

O método β -caroteno/ácido linoleico pode ser especialmente útil para as investigações de antioxidantes lipofílicos e é apropriado para a investigação da atividade antioxidante de óleos essenciais. Por outro lado, se compostos polares, como o ácido ascórbico, fossem testados apenas por ele, seriam considerados como antioxidantes fracos (Kulisic et al., 2004). Esse fato explica a menor eficiência do ácido ascórbico, quando comparado com o timol.

De acordo com Ruberto & Barata (2000), fenóis são antioxidantes eficientes, assim, as moléculas de timol e carvacrol são, de fato, responsáveis pela atividade antioxidante de muitos óleos essenciais que os contêm. Os álcoois são considerados como a segunda classe de monoterpenos oxigenados, que compõem os óleos essenciais, mais ativos quanto à atividade antioxidante, com ligeira predominância dos álcoois alílicos, como o geraniol. Comparando esses resultados com aqueles encontrados neste trabalho, pode-se explicar a grande atividade antioxidante do padrão timol e do óleo de capim-citronela, que possui como composto majoritário o citrônella, o geraniol e o citrônella, diante do óleo de canela, que possui como majoritário o aldeído cinâmico, do óleo gengibre, que é composto majoritariamente pelos aldeídos geraniol e neral e do padrão ácido ascórbico.

O método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta, quando esse é adicionado a substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, essa técnica baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (Huang et al., 2005; Tepe et al., 2005).

Entre os óleos essenciais em estudo, o que apresentou maior atividade antioxidante pelo teste do DPPH foi o óleo de citronela (CI_{50} 517,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), não foi observada atividade antioxidante significativa para os óleos essenciais de canela e gengibre; porém, entre os padrões avaliados, o ácido ascórbico (CI_{50} 3,32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente que o timol (Tabela 6). De acordo com Mata et al. (2007), devido à baixa solubilidade do óleo essencial e seus compostos nas condições do experimento, esse teste não deve ser aplicado para óleos essenciais.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de capim-citronela, cravo-da-índia e palmarosa foi evidenciada por Scherer et al. (2009), pelo método de DPPH. Eles observaram que o óleo de cravo-da-índia apresentou uma forte

atividade antioxidante, provavelmente por apresentar como composto majoritário o eugenol (83,7%), um fenilpropanoide hidroxilado como componente majoritário. Nas amostras de citronela, tendo como componentes majoritários o citronelal (45%), geraniol (20,71%) e citronelol (14,49%), e palmarosa contendo geraniol (80)%, e o acetato de geranila (12%), não foi observada atividade antioxidante significativa.

Singh et al. (2007), avaliando o potencial antioxidante de óleos voláteis e oleoresina de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (folhas e casca), utilizando a técnica de DPPH verificaram 52% de inibição do óleo essencial de canela a uma concentração de $1\mu\text{L.L}^{-1}$.

Estudos de Beal (2006) foram realizados para avaliar o poder antioxidante de extratos de gengibre pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. Nesse estudo, foram identificados e quantificados os compostos fenólicos presentes nas frações do gengibre: ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis. Pelos resultados obtidos, verificou-se que as frações de ácidos fenólicos do gengibre apresentaram considerável atividade antioxidante e significativo conteúdo de fenólicos totais, e uma alta correlação entre esses dois índices também pôde ser observada. Entre os ácidos fenólicos identificados nas frações, o ácido salicílico foi predominante, mas sua contribuição para a capacidade antioxidante total das frações pode ser dependente da presença de outros ácidos fenólicos da amostra.

5 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *Cymbopogon nardus* foram os monoterpenos acíclicos, citronelal (47,12%), geraniol (18,56%) e citronelol (11,07%); no óleo essencial da casca seca de *Cinnamomum zeylanicum*, foram identificados os fenilpropanoides (E)-cinamaldeído (77,72%), acetato de (E)-cinamila (5,99%) e o monoterpenóide 1,8-cineol (4,66%) como componentes majoritários; e no óleo essencial de *Zingiber officinale*, foram os monoterpenos oxigenados geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geranila (4,19%) e o monoterpeno bicíclico, canfeno (4,30%).

Os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana satisfatória, tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas, com exceção da espécie *E. coli*, que apresentou-se como a mais resistente, pois não foi constatado efeito inibitório dos óleos essenciais de *C. nardus* e *Z. officinale*.

A atividade antioxidante foi evidenciada pelo teste β -caroteno/ácido linoleico para *C. nardus* com $CI_{50} = 20,65 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para *Z. officinale* com $CI_{50} = 60,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para *C. zeylanicum* com $CI_{50} = 303,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$; e pelo teste do DPPH; foi observada apenas para *C. nardus* com $CI_{50} = 517,40 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. D. **Food microbiology**. 2. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.

AFZAL, M.; AL-HADIDI, D.; MENON, M.; PESEK, J.; DHAMI, M. S. Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, Shuwaikh, v. 18, n. 3/4, p. 159-90, 2001.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 114-140, jan./mar. 2007.

ALVES, H. de M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 3, p. 10-15, maio, 2001.

ANDRADE, M. de A.. **Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas**. 2008. 124 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

BAIRD-PARKER, A. C. *The Staphylococci*: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 19, p. 15-85, 1990.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BANIA, J.; DABROWSKA, A.; KORZEKWA, K.; ZARCZYNSKA, A.; BYSTRON, J.; CHRZANOWSKA, J.; MOLEND, J. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 315-320, Mar. 2006.

BARBEL, S.; YASHPHE, J. Effect of essential oil from *Achillea fragrantissima* on *Escherichia coli* cells. **Current Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 6, p.337-341, Dec. 1989.

BEAL, B. H. **Atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)**. 2006. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio 2009.

BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECCO R.; EHLERT, P. A. D.; SOUZA, I. F. de. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.17, n. 4, p. 557-64, out./dez. 2007.

BRASIL. Ministério dea Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> > Acesso em: 14 jan. 2010.

BRASIL. Ministério dea Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 64, de 16 de setembro de 2008. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Mistura Para o Preparo de Cappuccino. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 10 jul. 2000. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br> > Acesso em: 14 jan. 2010.

BRUGNERA, D. F. **Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas encontradas em alimentos frente a óleos essenciais**. 2008. 72 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 610-616, Oct./Dec. 2007.

CAO, H.; POLANSKYA, M. M.; ANDERSON, R. A. Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 459, n. 2, p. 214-222, Mar. 2007.

CAO, L.; SI, J. Y.; LIU, Y.; SUN, H.; JIN, W.; LI, Z.; ZHAO, X. H.; PAN, R. L. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* maxim. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 3, p. 801-805, Aug. 2009.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELU FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. v. 1, 81 p. (Textos Acadêmicos).

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

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 23-32, May 2007.

CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CASTRO, L. O. de ; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. , capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 23 p. (Boletim FEPAGRO).

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds—wisconsin, June 1998. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 40, p. 911-913, Oct. 2000.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, Trumbull, v. 12, n. 1, p. 1-55, Mar. 2004.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; WONG, L. F.; LIANTO, F. S.; WONG, S. K.; LIM, K. K.; JOE, C. E.; LIM, T. Y. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. **Food Chemistry**, London, v. 109, n. 3, p. 477-483, Aug. 2008.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, n. 5, p. 639-649. Sept./Oct. 2000.

CITÓ, A. M. G. L.; SOUZA, A. A.; LOPES, J. A. D.; CHAVES, M. H.; COSTA, F. B.; SOUSA, S. A. A.; AMARAL, M. P. M. Resina de *protium heptaphyllum* march (Burseraceae): composição química do óleo essencial e avaliação citotóxica frente a *artemia salina* leach. **Anais da Associação Brasileira de Química**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p. 74-76, 2003.

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4. p. 564-581, Oct. 1999.

DABAGUE, I. C. M.; MONTEIRO, R.; GARBUIO, C.; SOUZA, A. P.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L. C.; SHEER, A. DE P.; YAMAMOTO, C. Rendimento do óleo essencial de *zingiber officinale* em resposta a diferentes processamentos e tempo de extração. In: SÍMPOSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 4., 2007, Fortaleza. **Anais eletrônicos...** Fortaleza: UFC, 2007. Disponível em: <<http://www.ivsboe.padetec.ufc.br/CDSimposio/resumos.htm>>. Acesso em: 12 jan. 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, Mar. 2006.

DORMAN, D. H. J.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; STANLEY, G. D. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 15, n. 1, p. 12-16, Mar. 2000.

DREWNOWSKI, A.; GOMEZ-CARNEROS, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 72, n. 2, p. 1424-1435, Dec. 2000.

ELPO, E. R. S. E.; NEGRELLE, R. R. B. Cadeia produtiva do Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade. **Scientia Agrária**, Curitiba, v. 7, n. 1/2, p. 121-122, jan./dez. 2006.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, Sept. 1991.

FARMER, J. J.; MCWHORTER, A. C.; BRENNER, D. J.; MORRIS, G. K. The *Salmonella* - Arizona group of enterobacteriaceae: nomenclatura, classification and reporting. **Clinical Microbiology Newsletter**, New York, v. 6, p. 63-66, 1984.

FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C.R.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 179-184, jul./ago. 2006.

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

FISCHER, A.; VON EIFF, C.; KUCZIUS, T.; OMOE, K.; PETERS, G.; BECKER, K. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 461- 469, May 2007.

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

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

FREIRE, J. M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; TURNIDGE, J.; RENNIE, R.; RAMPHAL, R. Characterization of *pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global sentry antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 146-155, May 2001.

GINGER: its role in xenobiotic metabolism. **ICMR BULLETIN**, New Delhi, v. 33, n. 6, p. 57-63, June 2003.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 4, p. 982-989, Oct. 2009.

- GRAY, J. T.; FEDORKA-CRAY, P. J.; STABEL, T. S. J.; KRAMER, T. T. Natural transmission of *Salmonella choleraesuis* in swine. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 1, p. 141-146, Jan. 1996.
- GROSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo: Optinline, 2005. 300 p.
- GUENTHER, E. Oil of Cinnamon. In: THE ESSENTIAL OILS. New York: D. Van Nostrand, 1950. v. 4, p. 213-240.
- GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.
- GUTIERREZ, J. R.V. Dano oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Habana, v. 31, n. 2, p. 126-133, abr./jun. 2002.
- HABSAH, M.; AMRAN, M.; MACKEEN, M. M.; LAJIS, N. H.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N.; RAHMAN, A. A.; GHAFAR, A. M. Screening of zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 72, n. 3, p. 403-410, Oct. 2000.
- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: CULLEN, K. **Encyclopedia of Life Sciences**. London: Nature Publishing Group, 2001. p. 1-7.
- HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, Aug. 1998.
- HEUVELINK, A. E.; VAN DEN BIGGELAAR, F. L. A. M.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J. T. M.; HERBES, R. G.; HUYBEN, R.; NAGELKERKE, N.; MELCHERS, W. J. G.; MONNENS, L. A. H.; BOER, E. de. Occurrence of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n. 12, p.3480-3487, Dec. 1998.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agricultura and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Feb. 2005.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, N.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Japanese Journal of Medical Microbiology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2006.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbiología de los alimentos:** características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, 1996. 606 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos I:** significado e métodos de enumeración. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, 439 p.

ISLAM, M.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 63-70, Jan. 2005.

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

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K. K. Volatile constituents from *cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 15, p. 4344-4348, June 2003.

JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, Ca.M.; VALENTE, V.M. M.. Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 404-408, July/Aug. 2005.

JIANG, H.; SÓLYOM, A. M.; TIMMERMAN, B. N.; GANG, D. R. Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 19, n. 20, p. 2957-2964, Oct. 2005.

KAHL, R.; KAPPUS, H. **Toxicity of synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with natural antioxidants vitamin E**. Tanaka: Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und, 1993. (Forschung, 196).

KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; GARCIA, G. M. P.; IRINO, K.; GELII, D. S. Surto alimentar por *Salmonella Enteritidis* no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 127-131, 1995.

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

KANAFANIA, Z. A.; FOWLER JUNIOR, V. G., *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, España, v. 24, n. 3, p. 182-193, Mar. 2006.

KHELEF, N.; LECUIT, M.; BUCHRIESER, C.; CABANES, D.; DUSSURGET, O.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* and the genus *listeria*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. 3. ed. New York: Springer, 2005.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O. The bark and leaf essential oils of cinnamom (*Cinnamomum verum* Presl) grown at Paraná, Brazil. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p.281-285, set./dez. 1997.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 107, 711, Jan. 2000.

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

LAMBERT, R. J. W., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P., NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Spet. 2001.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; PATRIGNANI, F.; BELLETTI, N.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, n. 3/4, p. 201-208, Mar./Apr. 2004.

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

LIMA, R. K. **Óleos essenciais de *myristica fragrans* houtt e de *salvia microphylla* H. B. K.**: caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. 160 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIRA, E. N. **Ocorrência de doenças transmitidas por alimentos no período de 1999 a 2003, em Guarapuava-PR**: um levantamento epidemiológico. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P.; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M.; VARGAS, A. C. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan./fev. 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) rendle. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, n. 1, p. 73-6, Dec. 2002.

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella* spp em amostras de carcaças e miúdos de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal na zona oeste da cidade de São Paulo**: análise crítica entre a técnica convencional em meios de cultivo e reação em cadeia pela polimerase. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MALELE, R. S.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; KIBWAGE, I. O.; LÓPEZ, M. L.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A.; OLIVA, M. M.; DEMO, M. S. Essential oil of *Cymbopogon winterianus* jowitt from Tanzania: composition and antimicrobial activity. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, New Delhi v. 10, n. 1, p.83-7, 2007.

MALLET, A. **Quantificação e identificação de escherichia coli, pseudomonas aeruginosa e aeromonas hydrophila em água de propriedades leiteiras.** 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MANTLE, D.; ANDERTON, J. G.; FALKOUS, G. M.; BARNES, M.; JONES, P.; PERRY, E. K. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: biochemistry and molecular biology**, Amsterdam, v. 121, n. 4, p. 385-391, Dec. 1998.

MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p.429-32, jul./set. 2007.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; ERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A. J.; CHOMPREEDEA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 180-185, Mar. 2006.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 198-206, Feb. 2006.

MATTOS S. H.; CHAVES C. M. C.; INNECCO R.; CRUZ G. F. Estudos sobre a época de corte e espaçamento de alecrim-pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 996-997, 2000.

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

MONDELLO, F.; BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; SALVATORE, G.; CASSONE, A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.51, n. 5, p. 1223-1229, Mar. 2003.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINSNETO, J. S.; RONDINA, R.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, set./out. 2006.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan. 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. v. 23, n. 2 (Replaces M7-A6).

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.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

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**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2006.

PAYMENT, P.; RILEY, M. S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call for action. **American Academy of Microbiology**. Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.asm.org>> Acesso em: 5 jan. 2010.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *taphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA, R. C. B.; SILVA, A. J. R. da; BARBOSA, A. L. S.; SABAA-SRUR, A. U. O. Obtenção de óleo essencial e oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por arraste com vapor e extração com solvente. **Revista Universidade Rural: série ciências da vida**, Seropédica, v. 27, n. 1, p. 10-20, jan./jun. 2007.

PFEIFFER, E.; HEUSCHMID, F. F.; KRANZ, S.; METZLER, M. Microsomal hydroxylation and glucuronidation of [6]-gingerol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 23, p. 8769-8774, Oct. 2006.

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

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, n. 155, n. 7, p. 568-570, Sept. 2004.

PURSEGLOVE, J. W.; BROWN, E. G.; GREEN, C. L. Cinnamon and cassia. In: PURSEGLOVE, J. W. **Spices**. London: Longman, 1981. v. 1, p. 100-173. (Tropical Agriculture Series).

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul./ago. 2006.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 455 p.

ROCHA, S. F. R.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Influência de cinco temperaturas de secagem no rendimento e composição do óleo essencial de citronela *Cymbopogon winterianus* Jowitt. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 73-78. 2000.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 167-174, May 2000.

SACCHETTI, G. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2004.

SAFAEI-GHOMI, J.; EBRAHIMABADI, A. H.; DJAFARI-BIDGOLI, Z.; BATOOLI, H. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. **Food Chemistry**, Oxford, v. 115, n. 4, p. 1524-1528, Aug. 2009.

SAGINUR, R.; SUH, K. N. *Staphylococcus aureus* bacteraemia of unknown primary source: where do we stand? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 21-25, Nov. 2008.

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

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Mar. 1994.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA, N.; NETO, R. C.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. São Paulo: Varela, 2005. 164 p.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico- sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 385 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 3295-3302, Oct. 2008.

SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 9, p. 1650-1661, Sept. 2007.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 41, n. 1, jan./mar. 2005.

SOARES, R. P. **Atividade biológica dos óleos essenciais de gengibre, açafrão e louro sobre o fungo *Aspergillus carbonarius***. 2009. 65 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr. 2002.

SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 23-31, fev. 2003.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; BARBOSA, F. J. M. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 4, p. 549-558, jul. 2005.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA-NETO A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp: isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 41-45, jan./mar. 2006.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STOYANOVA, A.; DENEV, P.; GARGOVA, S. Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n. 3, p. 764-770, Oct. 2007.

SUBASH BABUA, P.; PRABUSEENIVASANA, S.; IGNACIMUTHU, S. Cinnamaldehyde: a potential antidiabetic agent. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 14, n. 1, p. 15-22, Jan. 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEBALDI, V. M. R. **Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle *pseudomonas* sp. e na formação de biofilmes por *pseudomonas aeruginosa***. 2008. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 333-340, May 2005

THOMSON, M.; AL-QATTAN, K. K.; AL-SAWAN, S. M.; ALNAQEEB, M. A.; KHAN, I.; ALI, M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. **Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 67, n. 6, 475-478, Dec. 2002.

TJENDRAPUTRA, E.; TRAN, V. H.; LIU-BRENNAN, D.; ROUFOGALIS, B.D.; DUKE, C. C. Effect of ginger constituents and synthetic analogues on cyclooxygenase-2 enzyme in intact cells. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 29, n. 3, p. 156-163, June 2001.

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

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, Apr. 2002.

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

VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 145-154, Dec. 2003.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WAN, X.; YAO, H. Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, Barking, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 833-839, Oct. 2006.

WANG, Z.; WU, N.; ZU, Y. G.; FU, Y. J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, Oxford, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, June 2008.

WENDAKOON, C. N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 3, p. 280- 283, Mar. 1995.

WICKENS A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 379- 391, Nov. 2001.

ANEXOS

ANEXO A	Página
FIGURA 1A Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Cymbopogon nardus</i>	75
FIGURA 2A Cromatograma do óleo essencial das cascas de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	76
FIGURA 3A Cromatograma do óleo essencial dos rizomas de <i>Zingiber officinale</i>	76

ANEXO B

Página

TABELA 1B	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> sobre <i>Salmonella Cholerasuis</i> ATCC 6539.....	77
TABELA 2B	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	78
TABELA 3B	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 1911.....	79
TABELA 4B	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229.....	80
TABELA 5B	Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853	81
TABELA 6B	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> e do padrão Timol pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).....	82
TABELA 7B	Atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-	

	picrilidrazila).....	83
TABELA 8B	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> e <i>Zingiber officinale</i> e dos padrões Timol e Ácido Ascórbico pelo teste β -caroteno/ácido linoleico.....	83

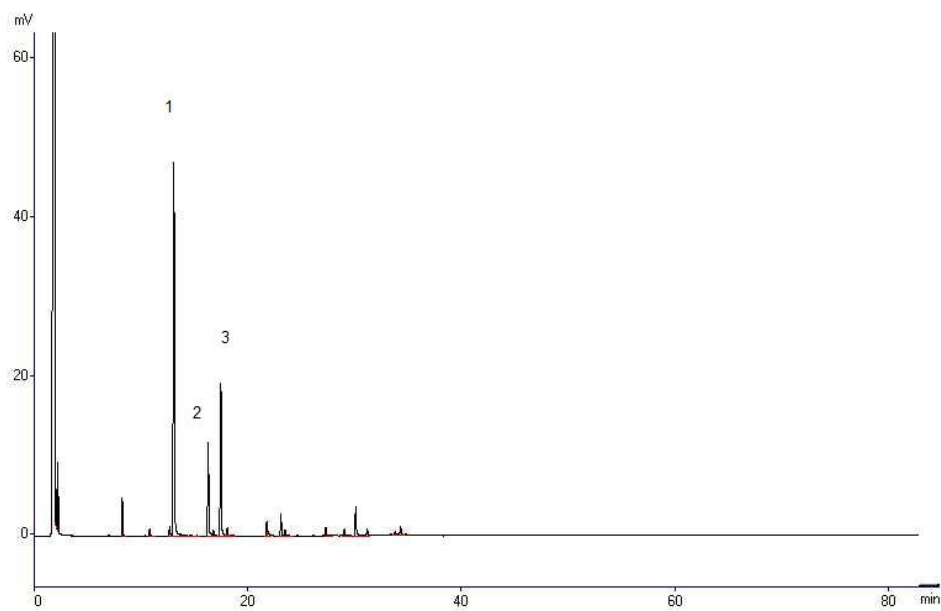


FIGURA 1A Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Cymbopogon nardus*. (1) citronelal; (2) citronelol; (3) geraniol.

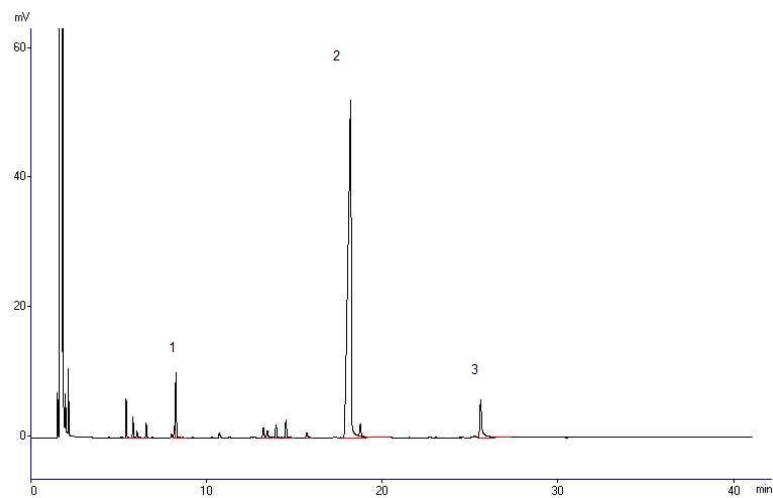


FIGURA 2A Cromatograma do óleo essencial das cascas de *Cinnamomum zeylanicum*. (1) 1,8-cineol; (2); (E)-cinamaldeído; (3) acetato (E)-cinamila.

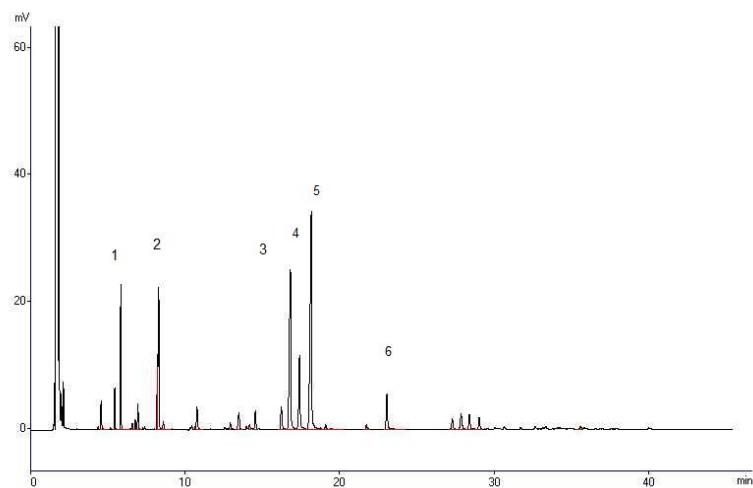


FIGURA 3A Cromatograma do óleo essencial dos rizomas de *Zingiber officinale*. (1) geraniol; (2) neral; (3) 1,8-cineol; (4) geraniol; (5) acetato de geraniol; (6) canfeno.

Tabela 1B Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* sobre *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539

Halo de inibição (cm)				
Proporção (óleo essencial/DMSO)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>C. nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>
DMSO	0	0 a	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0 a	0 a
1:32	15,62	0 a	0,23 b	0,20 b
1:16	31,25	0 a	0,60 b c	0,33 b c
1:8	62,5	0 a	1,16 d e	0,43 b c d
1:4	125	0,2 b	1,32 e	0,57 c d e
1:2	250	0,25 b c	1,93 f	0,72 d e
1:1	500	0,47 c	2,26 f	0,82 e f
Cloranfenicol	1g/L	1,15 d	0,83 c d	1,15 f
CV (%)		23,99	15,66	19,64

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

Tabela 2B Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Proporção (óleo essencial/DMSO)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)		
		<i>C. nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>
DMSO	0	0 a	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0,20 b	0,20 b
1:32	15,62	0 a	1,20 c	0,30 b
1:16	31,25	0,23 b	1,87 d	0,42 c
1:8	62,5	0,33 b c	2,23 e	0,50 c
1:4	125	0,45 c	2,42 e f	0,62 d
1:2	250	0,60 d	2,67 f	0,75 e
1:1	500	0,68 d	3,10 g	0,80 e
Cloranfenicol	1g/L	1,70 e	1,63 d	1,70 f
CV (%)		8,76	6,93	4,67

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

Tabela 3B Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117

Proporção (óleo essencial/DMSO)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)		
		<i>C. nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>
DMSO	0	0 a	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0,20 b	0 a
1:32	15,62	0 a	0,30 b	0,18 b
1:16	31,25	0,20 b	0,70 c	0,20 b
1:8	62,5	0,32 b c	1,16 d	0,30 c
1:4	125	0,43 c d	1,60 e	0,38 c
1:2	250	0,43 c d	1,76 e f	0,50 d
1:1	500	0,50 d	1,80 e f	0,76 e
Cloranfenicol	1g/L	1,37 e	1,96 f	1,70 f
CV (%)		8,99	6,76	5,49

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

Tabela 4B Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* sobre *Escherichia coli* ATCC 11229

Proporção (óleo essencial/DMSO)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)		
		<i>C. nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>
DMSO	0	0 a	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0 a	0 a
1:32	15,62	0 a	0,20 a b	0 a
1:16	31,25	0 a	0,53 b c	0 a
1:8	62,5	0 a	1,02 c d	0 a
1:4	125	0 a	1,03 c d	0 a
1:2	250	0 a	1,37 d	0 a
1:1	500	0 a	1,20 d	0 a
Cloranfenicol	1g/L	1,63 b	1,37 d	1,50 b
CV (%)		24,99	22,85	35,14

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

Tabela 5B Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853

Proporção (óleo essencial/DMSO)	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)		
		<i>C. nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>
DMSO	0	0 a	0 a	0 a
1:256	1,95	0 a	0 a	0 a
1:128	3,90	0 a	0 a	0 a
1:64	7,81	0 a	0,33 b	0 a
1:32	15,62	0 a	0,70 b c	0 a
1:16	31,25	0 a	1,05 c d	0 a
1:8	62,5	0 a	1,38 d e	0,20 b
1:4	125	0 a	1,82 e f	0,30 c
1:2	250	0,20 b	1,97 f	0,65 d
1:1	500	0,30 c	2,07 f	0,48 e
Cloranfenicol	1g/L	1,27 d	0,75 b c	1,15 f
CV (%)		9,56	15,00	3,96

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

Tabela 6B Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* e do padrão Timol pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>C.nardus</i>	<i>C. zeylanicum</i>	<i>Z. officinale</i>	Timol
5	0,83 a	1,59 a	0,70 a	20,21 a
10	1,53 a	1,04 a	0,98 a b	27,07 b
25	3,10 a	1,07 a	1,34 a b	39,63 c
50	6,20 b	1,13 a	1,94 a b	49,90 d
100	11,58 c	1,79 a b	2,03 b	61,81 e
300	31,88 d	3,47 b c	6,09 c	78,32 f
500	46,69 e	3,78 c	9,09 d	84,88 g
CV (%)	6,06	32,12	14,10	1,39

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

Tabela 7B Atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ácido Ascórbico
1	12,13 a
2,5	34,87 b
5	71,91 c
10	94,86 d
25	96,54 d
50	96,61 d
100	96,68 d
CV (%)	1,03

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

Tabela 8B Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* e dos padrões Timol e Ácido Ascórbico pelo teste β -caroteno/ácido linoléico

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	C. <i>nardus</i>	C. <i>zeylanicum</i>	Z. <i>officinale</i>	Timol	Ácido Ascórbico
5	34,27 a	15,12 a	11,87 a	2,00 a	3,00 a
10	25,88 a	10,55 a	15,67 a b	2,94 a	4,11 a
25	44,61 b	15,30 a	23,71 b	65,50 b	26,39 b
50	62,23 c	12,92 a	43,42 c	74,71 c	42,59 b c
100	76,16 d	25,28 b	53,13 d	78,61 d	60,11 c d
200	83,48 e	35,68 c	63,91 e	81,05 e	66,97 d
CV (%)	2,72	8,57	5,40	0,88	12,46

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