

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

**Sheila Mello da Silveira**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS  
ESSENCIAIS E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
LOURO (*L. nobilis*) COMO AGENTE CONSERVADOR  
NATURAL EM EMBUTIDO CÁRNEO FRESCAL**

**Florianópolis**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**

**Sheila Mello da Silveira**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS  
ESSENCIAIS E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
LOURO (*L. nobilis*) COMO AGENTE CONSERVADOR  
NATURAL EM EMBUTIDO CÁRNEO FRESCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do grau de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profa Cleide Rosana Werneck Vieira, Ph.D.

Florianópolis

2012



**Sheila Mello da Silveira**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E  
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS E ÓLEOS  
ESSENCIAIS E APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
LOURO (*L. nobilis*) COMO AGENTE CONSERVADOR  
NATURAL EM EMBUTIDO CÂRNEO FRESCAL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 20 de abril de 2012

Prof. Roseane Fett, Dra.  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

Profª Cleide Rosana Werneck Vieira, Ph.D.  
(UFSC) (Orientadora)

Profª Leadir Lucy Martins Fries, Ph.D.  
(UFSM) (Membro)

Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano  
(PUC-PR) (Membro)

Prof. Dr. César Damian  
(UFSC) (Membro)

Profª Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro  
(UFSC) (membro)

Profª Dra. Roseane Fett (UFSC)  
(Suplente)



Aos meus pais, Paulo e Vera, exemplos de  
vida e de valores, dedico este trabalho.



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, por possibilitar e apoiar a realização desta etapa de minha formação profissional.

À Embrapa Suínos e Aves, pela importante parceria de trabalho, especialmente ao Dr. Gerson Scheuermann e ao incansável parceiro nesta pesquisa, M.Sc. Anildo Cunha Jr., pelo inestimável auxílio prestado na realização deste trabalho, especialmente na preparação dos extratos hidroalcoólicos, extração dos óleos essenciais, análises físico-químicas e cromatográficas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa cedida, através do Programa Institucional de Qualificação Docente para a Rede Federal de Educação Profissional, Científica e Tecnológica – PIQDTec.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo apoio financeiro a este projeto.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Unidade de Concórdia, em especial à Rosani Michelin, por sugerir o estudo de diversas espécies vegetais que fizeram parte deste trabalho e por manter, em parceria com a Cooperativa de Produção e Consumo Concórdia – COPÉRDIA – e com o IFC - Campus Concórdia, o horto de plantas medicinais em nosso Campus.

À minha orientadora, professora Cleide Rosana Werneck Vieira, por me receber no programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e por aceitar a orientação deste trabalho. Agradeço de forma especial pelos ensinamentos, por seu apoio e força nos momentos difíceis, e também pela confiança depositada em meu trabalho.

Ao professor Marcelo Maraschin, pela sugestão de espécies vegetais para o estudo, principalmente a espécie *Campomanesia eugenioides* (guabirola) e pelo inestimável auxílio na revisão do

manuscrito referente ao quarto capítulo desta tese. Agradeço de forma especial sua sincera e constante disposição em ajudar.

À professora Renata Dias de Mello Castanho Amboni, pelas importantes sugestões referentes à análise sensorial.

Ao Dr. Arlei Coldebela, da Embrapa Suínos e Aves, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Dr. André Jasper (Univates - RS) e aos Drs. Sólon Jonas Longhi, Marcelo Callegari Scipioni e André Rosalvo Terra Nascimento (UFSC – RS), pela identificação botânica das espécies vegetais.

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos da UFSC, pela convivência e pelas experiências compartilhadas. Em especial à Andréia Cirolini, pela amizade e por pacientemente receber e encaminhar meus relatórios trimestrais.

Aos meus colegas do IFC – Campus Concórdia, em especial aos colegas da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela troca de ideias, pelas sugestões e por solidariamente acompanharem os percalços enfrentados no decorrer deste trabalho.

Aos alunos do curso de Tecnologia em Alimentos do IFC – Campus Concórdia, bolsistas e estagiários do laboratório de microbiologia de alimentos (por ordem de chegada): Fábio Luiz Secchi, Silvani Verruck, Taionara Mocellin, Marisete Krohn, Aline Schimidt, Andressa Gaio e Graciele Rosa, pela dedicação e auxílio na realização das análises microbiológicas e físico-químicas.

À D. Ivanete Pozzo, conhecedora das plantas medicinais e de seus usos populares, pelo carinho, amizade, e pela boa-vontade em compartilhar seus conhecimentos e ceder as plantas por ela cultivadas.

Aos meus pais, Vera Maria Mello da Silveira e Paulo Roberto Souza da Silveira, que me auxiliaram de todas as formas possíveis durante a realização deste trabalho, apoiando, incentivando, acompanhando de perto os desafios, dificuldades e conquistas no decorrer deste doutorado.

Ao meu irmão João Paulo e à amiga Janaína, pelo acolhimento em Florianópolis, pelo apoio e pela convivência no período em que lá permaneci.

À minha irmã Lívia, que mesmo de longe acompanhou e auxiliou com suas palavras e pensamentos de incentivo e bom ânimo.

Ao meu companheiro Felipe, pelo amor, carinho, força, incentivo, paciência e apoio em todos os momentos,

Minha sincera gratidão.



Silveira, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo fresco**. 2011. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

Santa Catarina está entre os principais estados produtores de alimentos. A região Oeste do estado caracteriza-se por sua forte indústria agroalimentar, alicerçada historicamente em unidades familiares de produção. Estão instaladas no estado as maiores agroindústrias do país, além de centenas de micro e pequenas indústrias alimentícias. A conservação dos alimentos, bem como a garantia de sua inocuidade e segurança continua sendo um tema de importância na produção de alimentos, verificando-se atualmente uma tendência de inclusão de aditivos naturais capazes de preservá-los das alterações químicas e microbiológicas indesejáveis. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e determinar a composição e a atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de plantas cultivadas na região Oeste de Santa Catarina, a fim de selecionar espécies promissoras para aplicação em alimentos, visando à extensão da vida de prateleira e à garantia da segurança e qualidade microbiológica. O teor de compostos fenólicos e flavonóides totais, a capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS e a capacidade de complexação com o  $Fe^{2+}$  foram determinados para extratos hidroalcoólicos provenientes de 12 espécies vegetais. A atividade antimicrobiana desses extratos e também de óleos essenciais provenientes de outras 10 espécies vegetais foi detectada pelo método de difusão em disco e a concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos produtos mais ativos foram determinadas pelo método de microdiluição. A composição majoritária dos óleos essenciais foi determinada por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-DIC e CG-EM). A partir dos ensaios realizados *in vitro* e considerando a compatibilidade sensorial, aplicou-se o óleo essencial de louro (*Laurus nobilis* L.) em linguiça fresca Toscana, nas concentrações de 0,05 e 0,1% sobre a massa cárnea. O embutido foi periodicamente

avaliado quanto à rancificação, pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBARS), quanto ao pH e quanto à contaminação microbiológica, através da contagem total de micro-organismos mesófilos e psicotróficos, contagem de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e bactérias lácticas. As linguiças adicionadas do óleo essencial não apresentaram diferença significativa nos valores de TBARS, comparativamente ao controle. O pH foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior durante o período de armazenamento, coerentemente à menor contaminação microbiana destas amostras em relação ao controle. As linguiças com adição de óleo essencial apresentaram menores contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos, micro-organismos psicotróficos, bactérias lácticas e coliformes totais. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por coliformes termotolerantes e *S. aureus* nos dias 0 e 14 de estocagem. A adição do óleo essencial de louro à linguiça frescal Toscana pode ser considerada promissora, uma vez que houve uma redução considerável na contaminação por coliformes totais, chegando a 2,8 ciclos logarítmicos (0,1% de óleo essencial adicionado), além de um aumento de dois dias na vida útil do produto, verificado através da contagem total de micro-organismos psicotróficos. Estes efeitos foram observados utilizando-se concentrações de óleo essencial inferiores à média das CMI determinadas *in vitro*. O produto foi considerado aceitável sob o ponto vista sensorial, em ambas as concentrações testadas.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais. *Laurus nobilis*. extratos vegetais. atividade antimicrobiana. atividade antioxidante. embutido frescal. linguiça Toscana.

Silveira, S. M. **Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of plant extracts and essential oils and the application of laurel (*L. nobilis*) essential oil as a natural preservation agent in fresh meat sausage.** 2012. Thesis (Doctorate in Food Science) – Post-Graduation Program in Food Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

## ABSTRACT

Santa Catarina is one of the main food-producing states in Brazil. The western region of that state has a strong agri-food industry, historically supplied by family-owned small farms. Plants of the largest Brazilian food companies, in addition to hundreds of small food companies, are located in that state. Food preservation, as well as food safety assurance, are important aspects of food production and the current trend is to apply natural additives that are capable of preserving foods from undesirable chemical and microbiological changes. The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of hydro-alcoholic plant extracts and to determine the chemical composition and the antimicrobial activity of essential oils extracted from plants cultivated in the Western region of Santa Catarina, aiming at selecting species that could be applied to food products to increase their shelf life and to improve their microbiological quality. Total phenolic and flavonoid contents, DPPH and ABTS quenching capacity, and Fe<sup>2+</sup> chelation capacity were determined in hydro-alcoholic extracts from 12 plant species. The antimicrobial activity of these extracts and of the essential oils of other 10 plant species was determined by agar disc diffusion method, and the minimal inhibitory concentration (CMI) and minimal bactericidal concentration (CMB) of the most active products were determined by the microdilution method. The main composition of essential oils was determined by gas chromatography and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-FID and GC-MS). Based on the results of the *in-vitro* assays and considering sensorial compatibility, laurel (*Laurus nobilis* L.) essential oil was applied to Tuscan fresh sausage at 0.05 e 0.1%. The sausage was regularly evaluated for rancification, using the thiobarbituric acid method (TBARS), for pH, and for microbiological contamination, by counting total mesophilic and psychrotrophic microorganisms, total coliforms and thermo-tolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* and lactic acid

bacteria. The sausages containing laurel essential oil presented similar TBARS values as those of the control sausage. However, their pH was significantly lower ( $p < 0.05$ ) during the storage period, which is consistent with their lower microbial contamination compared with the control sausage. Sausages with laurel essential oil presented lower counts of mesophilic aerobes, psychrotrophs, lactic acid producing bacteria and total coliforms. No contamination with thermo-tolerant coliforms or *S. aureus* was detected on days 0 and 14 of storage in any of the sausage samples. The addition of laurel essential oil to Tuscan fresh sausage significantly reduced total coliform contamination in up to 2.8 log and increased in two days product shelf life, as determined by the total count of psychrotrophic microorganisms. These effects were observed using lower essential oil concentrations than those previously used in *in-vitro* tests. The product was considered acceptable from the sensorial standpoint at both concentrations tested. The overall results indicate a promising application of laurel essential oil in fresh sausages.

**Key words:** essential oils; *Laurus nobilis*; plant extracts; antimicrobial activity; antioxidant activity; fresh sausage; Tuscan sausage.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.** Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário. Fonte: Taiz e Zeiger (2004) ..... 38
- Figura 2.** Fórmula estrutural de alguns compostos terpênicos. Fonte: adaptado de Burt (2004)..... 40
- Figura 3.** Estruturas básicas dos flavonóides. Fonte: adaptado de Rice-Evans, Miller e Paganga (1997)..... 42
- Figura 4.** Mecanismo de ação proposto para o carvacrol: molécula não dissociada difunde-se através da membrana celular e se dissocia no interior da célula, liberando  $H^+$  no citoplasma. Retorna novamente ao meio extracelular na forma não dissociada, carregando um íon  $K^+$ . Um novo próton é ligado à molécula de carvacrol e esta difunde-se novamente através da membrana, reiniciando o processo. Fonte: adaptado de Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) ..... 50
- Figura 5.** Alguns mecanismos de ação reportados para os óleos essenciais e seus componentes e sua localização na célula bacteriana. Fonte: Burt (2004) ..... 52
- Figura 6.** Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica. Fonte: adaptado de Ramalho e Jorge (2006) ..... 55

### Capítulo 5

- Figura 1.** Cinética de inativação de *E. coli* pelo óleo essencial de louro. C: controle; CMI=CMB: óleo essencial adicionado na concentração mínima inibitória e bactericida (2,5 mg/mL);  $\frac{1}{2}$  CMI= $\frac{1}{2}$  CMB: óleo essencial adicionado em 50% da concentração mínima inibitória e bactericida (1,25 mg/mL) ..... 183
- Figura 2.** Cinética de inativação de *Y. enterocolitica* pelo óleo essencial de louro. C: controle; CMB: óleo essencial adicionado na concentração mínima bactericida (2,5 mg/mL); CMI: óleo essencial adicionado na concentração mínima inibitória (1,25 mg/mL) ..... 184

<b>Figura 3.</b> Contagem de micro-organismos psicrotróficos nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C. ....	186
<b>Figura 4.</b> Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C. ....	187
<b>Figura 5.</b> Contagem de bactérias lácticas nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C. ....	189
<b>Figura 6.</b> Contagem de coliformes totais nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C. ....	190
<b>Figura 7.</b> Evolução do pH das linguiças frescas controle e formuladas com óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C. ....	193

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

<b>Tabela 1.</b> Identificação das espécies vegetais, registro, data de coleta e parte utilizada para a obtenção dos óleos essenciais .....	84
<b>Tabela 2.</b> Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos).....	90
<b>Tabela 3.</b> Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, detectada no ensaio de difusão em disco (mm) .....	99
<b>Tabela 4.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais testados (mg/mL) ...	101

### Capítulo 3

<b>Tabela 1.</b> Espécies vegetais, número de registro e partes utilizadas na obtenção dos óleos essenciais.....	117
<b>Tabela 2.</b> Composição química dos óleos essenciais de <i>C. winterianus</i> , <i>E. paniculata</i> e <i>L. angustifolia</i> .....	122
<b>Tabela 3.</b> Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>C. winterianus</i> , <i>E. paniculata</i> e <i>L. angustifolia</i> , detectada através do teste de difusão em disco (mm).....	125
<b>Tabela 4.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais de <i>C. winterianus</i> , <i>E. paniculata</i> e <i>L. angustifolia</i> (mg/mL).....	126

### Capítulo 4

<b>Tabela 1.</b> Identificação das espécies vegetais, registro e parte utilizada para a extração.....	140
<b>Tabela 2.</b> Conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos avaliados .....	146
<b>Tabela 3.</b> Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos avaliada pelos métodos do DPPH, ABTS e complexação com o Fe <sup>2+</sup>	149
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes de correlação de Spearman entre os ensaios realizados.....	152

<b>Tabela 5.</b> Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos avaliados no teste de difusão em disco .....	154
<b>Tabela 6.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos hidroalcoólicos mais ativos contra micro-organismos selecionados de importância em alimentos (mg/mL) .....	160

## Capítulo 5

<b>Tabela 1.</b> Ingredientes utilizados (%) na formulação da lingüiça Toscana .....	176
<b>Tabela 2.</b> Composição química do óleo essencial de louro, determinada por CG-FID e CG-MS .....	180
<b>Tabela 3.</b> Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de louro (mg/mL).....	181
<b>Tabela 4.</b> Valores de TBARS (mg MDA/kg) das lingüiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C .....	194
<b>Tabela 5.</b> Média dos escores obtidos na avaliação sensorial das lingüiças adicionadas de óleo essencial .....	196

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABTS – radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- ANOVA – análise de variância
- APHA – *American Public Health Association*
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- ATP – adenosina trifosfato
- BHA – butilhidroxianisol
- BHI – caldo infusão cérebro coração
- BHT – butilhidroxitolueno
- CG – cromatografia gasosa
- CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMB – concentração mínima bactericida
- CMI – concentração mínima inibitória
- DIC – detector de ionização de chama
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DPPH – radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
- EAG – equivalente de ácido gálico
- EC – equivalente de catequina
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- EM – espectrometria de massas
- GRAS – *Generally Recognized as Safe*
- HDCF – Herbário Florestal do Laboratório de Dendrologia
- HVAT – Herbário do Museu de Ciências Naturais
- IC<sub>50</sub> – concentração inibitória
- IR – índice de retenção
- ISO – *International Standard Organization*
- Log – logaritmo
- MDA – malonaldeído
- MRS – ágar de Man Rogosa & Sharp

MRSA – linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

OE – óleo essencial

PCA – *Plate Count Agar*

ppm – partes por milhão

PVC – policloreto de vinila

TBARS – substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico

TBHQ – butilhidroxiquinona terciária

TCA – ácido tricloroacético

TEAC – capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

TSA – ágar triptose de soja

TSB – caldo triptose de soja

TTC – cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio

UFC – unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

<b>Introdução.....</b>	<b>29</b>
Objetivo Geral.....	30
Objetivos Específicos.....	30
<b>Capítulo 1</b>	
<b>Revisão bibliográfica.....</b>	<b>33</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
1.1 Compostos bioativos de origem vegetal.....	35
1.2 Metabólitos Secundários.....	37
1.2.1 Compostos terpênicos.....	38
1.2.2 Compostos fenólicos.....	39
1.3 Extratos vegetais.....	43
1.4 Óleos essenciais.....	46
1.4.1 Composição dos óleos essenciais.....	47
1.4.2 Funções e aplicações dos óleos essenciais.....	48
1.5 Mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos vegetais.....	49
1.6 Atividade antioxidante de óleos essenciais e extratos vegetais.....	53
1.6.1 Oxidação lipídica.....	53
1.6.2 Antioxidantes.....	55
1.7 Microbiota da carne e embutidos frescos.....	57
1.7.1 Carne fresca.....	57
1.7.2 Embutidos frescos.....	59
1.8 Aplicação de óleos essenciais e extratos vegetais em carnes e produtos cárneos.....	61
<b>2 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## Capítulo 2

**Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas selecionadas cultivadas no sul do Brasil contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos ..... 79**

**RESUMO ..... 81**

**ABSTRACT ..... 81**

**1 INTRODUÇÃO ..... 82**

**2 MATERIAL E MÉTODOS ..... 83**

2.1 Material vegetal e extração dos óleos essenciais ..... 83

2.2 Preparo das soluções para as análises cromatográficas ..... 85

2.3 Análise por cromatografia gasosa (CG/DIC) ..... 85

2.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ..... 86

2.5 Atividade antimicrobiana ..... 86

2.5.1 Culturas bacterianas ..... 86

2.5.2 Detecção da atividade antimicrobiana – ensaio de difusão em disco ..... 87

2.5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB) ..... 87

2.6 Análise estatística ..... 88

**3 RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 89**

3.1 Composição química dos óleos essenciais ..... 89

3.2 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais avaliados ..... 98

**4 REFERÊNCIAS ..... 105**

## CAPÍTULO 3

**Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon winterianus*), eucalipto (*Eucalyptus paniculata*) e lavanda (*Lavandula angustifolia*) ..... 111**

**RESUMO ..... 113**

**ABSTRACT ..... 113**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>114</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>116</b>
2.1 Material vegetal e extração dos óleos Essenciais .....	116
2.2 Preparo das soluções para as análises cromatográficas .....	117
2.3 Análise por cromatografia gasosa (CG/DIC) .....	118
2.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) .....	118
2.5 Atividade antimicrobiana .....	119
2.5.1 Culturas bacterianas .....	119
2.5.2 Detecção da atividade antimicrobiana – ensaio de difusão em disco .....	119
2.5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	120
2.6 Análise estatística .....	121
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>121</b>
<b>4 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>129</b>

#### **Capítulo 4**

<b>Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos vegetais para a identificação de fontes potenciais de agentes conservadores naturais para alimentos</b> .....	<b>135</b>
---	------------

<b>RESUMO</b> .....	<b>137</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>137</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>138</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>140</b>
2.1 Material vegetal e preparação dos extratos .....	140
2.2 Determinação de compostos fenólicos totais .....	141
2.3 Determinação de flavonóides totais .....	141
2.4 Capacidade de sequestro do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).....	142
2.5 Capacidade de sequestro do radical 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS).....	142

2.6 Capacidade de complexação com o Fe <sup>2+</sup> .....	143
2.7 Atividade antimicrobiana .....	143
2.7.1 Culturas bacterianas .....	143
2.7.2 Detecção da atividade antimicrobiana – ensaio de difusão em disco .....	143
2.7.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB) .....	144
2.8 Estatística .....	145
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>145</b>
3.1 Conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides totais dos extratos .....	145
3.2 Atividade antioxidante .....	147
3.2.1 Ensaio de captura de radicais livres .....	147
3.2.2 Capacidade de complexação com o Fe <sup>2+</sup> .....	150
3.3 Correlações entre o conteúdo de compostos fenólicos totais, conteúdo de flavonóides totais e a atividade antioxidante dos extratos avaliados .....	151
3.4 Atividade antimicrobiana – teste de difusão em disco .....	153
3.5 CMI e CMB .....	159
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>161</b>

## Capítulo 5

<b>Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de louro (<i>L. nobilis</i>) em linguiça frescal toscana .....</b>	<b>167</b>
--	------------

<b>RESUMO .....</b>	<b>169</b>
---------------------	------------

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>169</b>
-----------------------	------------

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>170</b>
---------------------------	------------

<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>172</b>
-----------------------------------	------------

2.1 Material vegetal e obtenção do óleo essencial .....	172
---	-----

2.2 Determinação da composição do óleo essencial .....	172
--	-----

2.2.1 Preparo das soluções para as análises cromatográficas .....	172
---	-----

2.2.2 Análise por cromatografia gasosa (CG/DIC) .....	172
---	-----

2.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) .....	173
2.3 Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do óleo essencial de louro .....	174
2.3.1 Culturas bacterianas .....	174
2.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	174
2.3.3 Ensaios de cinética de inativação de <i>E. coli</i> e <i>Y. enterocolitica</i> em caldo .....	175
2.4 Elaboração do embutido frescoal .....	176
2.5 Análises microbiológicas .....	177
2.6 Determinação de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	178
2.7 Determinação do pH.....	178
2.8 Análise sensorial .....	178
2.9 Análise estatística .....	179
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>179</b>
3.1 Composição do óleo essencial.....	179
3.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) .....	181
3.3 Cinética de inativação de <i>E. coli</i> e <i>Y. enterocolitica</i> em caldo.....	182
3.4 Aplicação do óleo essencial de louro em linguiça frescoal Toscana .....	185
3.4.1 Análises microbiológicas .....	185
3.4.2 Avaliação da rancidez oxidativa e do pH.....	192
3.5 Análise sensorial .....	195
<b>4 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>197</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>205</b>
<b>ANEXO - Parecer do comitê de ética .....</b>	<b>209</b>
<b>APÊNDICE - Ficha de avaliação sensorial .....</b>	<b>213</b>



## INTRODUÇÃO

Santa Catarina está entre os principais estados produtores de alimentos. A região Oeste do estado caracteriza-se por sua forte indústria agroalimentar, alicerçada historicamente em unidades familiares de produção, tendo construído em algumas décadas o maior centro agroindustrial de aves e suínos do país.

A indústria de alimentos tem dentre seus principais desafios a minimização das alterações químicas, a inibição da deterioração microbiana e o controle da contaminação por patógenos (PRÄNDL et al., 1994; DEVLIEGHIERE et al., 2004).

Apesar do desenvolvimento de diversos métodos para a conservação dos alimentos, as doenças de origem alimentar constituem, ainda nos dias de hoje, um sério problema no mundo todo, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. De acordo com o Ministério da Saúde (SVS/MS, 2008), no período de 1999 a 2008, foram notificados 6.062 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, envolvendo 117.330 pessoas doentes. Em 84% dos casos notificados, as bactérias constituíram o agente etiológico, sendo que os alimentos mais frequentemente envolvidos (cerca de 60% dos casos) foram os de origem animal. Vários fatores contribuem para a crescente importância dada a estas enfermidades, como uma maior variedade de alimentos, incluindo aqueles prontos para o consumo, a produção em massa e a distribuição internacional dos alimentos. A prevalência de patógenos antibiótico-resistentes também deve ser considerada (ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997; HANAMANTHAGOUDA et al., 2010).

Por outro lado, a oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração da qualidade dos alimentos, levando ao aparecimento de odores e sabores desagradáveis, além de reduzir a qualidade nutricional e dar origem a produtos de oxidação potencialmente tóxicos (NAWAR, 2000; ARAÚJO, 2001; OWUSU-APENTEN, 2005).

Devido a questões de toxicidade apresentada por certos aditivos sintéticos e à preferência dos consumidores por alimentos mais naturais e saudáveis, verifica-se atualmente um interesse crescente na busca por aditivos naturais capazes de preservar os alimentos das alterações indesejáveis (PAPAS, 1993; JAYAPRAKASHA et al., 2004; GACHKAR et al., 2007; OKE et al. 2009; EBRAHIMABADI et al., 2010).

Sabe-se que condimentos à base de ervas e especiarias são ingredientes geralmente utilizados para realçar o sabor e o odor dos alimentos. Entretanto, além de conferir características sensoriais, muitos condimentos apresentam também propriedades nutricionais, antioxidantes e antimicrobianas, entre outras (SHYLAJA; PETER, 2004). Muitas espécies vegetais de uso medicinal consagrado também podem constituir-se em fontes importantes de compostos com tais atividades (MILITELLO et al., 2011). Os benefícios de sua aplicação podem ir desde o favorecimento da conservação dos alimentos até a inclusão de fatores nutricionais suplementares e propriedades benéficas à saúde (SACCHETTI et al., 2005). Suas vantagens mercadológicas também são evidentes, em função da forte demanda atual por produtos naturais, não tóxicos e ambientalmente seguros (OKE et al., 2009; RAHMAN; KANG, 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010).

Neste contexto, as pesquisas direcionadas ao desenvolvimento destes produtos alternativos podem contribuir para a indústria de alimentos, permitindo a comercialização de produtos diferenciados e com maior vida de prateleira.

## OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e determinar a composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais selecionados para aplicação em embutido cárneo frescal, visando à extensão da vida de prateleira e à garantia da segurança e qualidade microbiológica do produto.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter, por destilação a vapor, óleos essenciais a partir de 10 espécies vegetais cultivadas na região Oeste catarinense;
- Obter, via maceração em solução hidroalcoólica, extratos provenientes de 12 espécies vegetais de ocorrência no estado de Santa Catarina;
- Detectar atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos vegetais e óleos essenciais obtidos frente a 12 espécies de micro-organismos de importância em alimentos;

- Determinar a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais e extratos vegetais que se mostrarem mais ativos frente a seis espécies de micro-organismos de importância em alimentos;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos;
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos obtidos, através de três metodologias distintas;
- Realizar a identificação e a quantificação dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais;
- Aplicar um produto vegetal selecionado a partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro* em linguiça frescal Toscana;
- Monitorar a evolução da contaminação microbiana, do pH e da rancificação da linguiça frescal Toscana durante o armazenamento a 7 °C;
- Avaliar a aceitabilidade sob o ponto de vista sensorial da linguiça Toscana adicionada do produto natural.



**CAPÍTULO 1**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM VEGETAL

A vida vegetal tem sido, ao longo das eras de evolução, alimento e remédio para todo o tipo de espécies animais, das mais primitivas às mais especializadas. A busca e o uso de plantas com propriedades terapêuticas é uma prática multimilenar, atestada em vários tratados de fitoterapia das grandes civilizações há muito desaparecidas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; SILVA JÚNIOR, 2003). Há evidências arqueológicas de que já os primeiros hominídeos, há 60.000 anos, faziam uso de ervas como o malvaíscio (*Althaea officinalis*). Os primeiros textos esculpidos conhecidos, hieróglifos egípcios de 6.000 anos, fazem referência à utilização de plantas com fins medicinais. O papiro de Ebers, datado de 2.400 a.C., é considerado o primeiro documento escrito acerca da fitoterapia, e faz referência à utilização de alho pelos trabalhadores que construíram as pirâmides, a fim de preservar-lhes a saúde (BAKOS, 2001).

O uso das espécies vegetais remonta ao momento em que o homem despertou para a consciência e iniciou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício. Esta prática, atividade humana por excelência, ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz, representando muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (DI STASI, 1996). Existem vários sistemas de medicina baseados na utilização de plantas medicinais, sendo os mais importantes dentro da medicina Chinesa e Indiana (*Ayurvedica*) (PETER, 2004).

A origem da descoberta das propriedades medicinais de espécies vegetais se encontra na observação constante e sistemática dos fenômenos e características da natureza e na conseqüente experimentação empírica desses recursos. A observação do comportamento dos animais, domesticados ou não, foi um dos principais procedimentos usados para a descoberta das propriedades medicinais das espécies vegetais. Além disso, o homem deve ter avaliado por si

mesmo várias espécies, que de alguma forma sugeriram a potencialidade de uso para amenizar seus problemas, seja como medicamento, seja como alimento ou para a produção de ferramentas e artesanatos (DI STASI, 1996).

O interesse pela utilização que outros povos fazem dos elementos do seu ambiente natural também vem desde a antiguidade, buscando, geralmente, preencher fins utilitaristas. A Etnobotânica pode ser definida como “a disciplina que se ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal; este estudo engloba tanto a maneira como um grupo social classifica as plantas, como os usos que dá a elas” (AMOROZO, 1996).

A Etnofarmacologia, ramo da Etnobotânica, trata de práticas médicas, especialmente remédios, usados em sistemas tradicionais de medicina (ELISABETSKY; SOUZA, 2007). Segundo estas autoras, a definição mais aceita da Etnofarmacologia é “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (HOLMSTEDT; BRUHN, 1983, *apud* ELISABETSKY; SOUZA, 2007).

A comparação de resultados obtidos com a coleta de plantas ao acaso ou quimiotaxonomicamente orientadas com aqueles obtidos com base no uso popular tem demonstrado que o conhecimento tradicional é indicativo de espécies que acumulam compostos bioativos (ELISABETSKY; SOUZA, 2007; KAILEH et al., 2007).

O estudo de plantas a partir de indicações de uso por sociedades autóctones, de tradição oral, pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre estas plantas, com grande economia de tempo e dinheiro. Ela permite planejar a pesquisa a partir de um conhecimento empírico já existente, e muitas vezes consagrado pelo uso contínuo, que deverá então ser testado em bases científicas. Neste sentido, cabe salientar que a maior parte das plantas com compostos bioativos, como também o saber associado ao seu uso para fins medicinais, encontra-se nos países subdesenvolvidos - ou em desenvolvimento -, ou ainda em etnias minoritárias dos países desenvolvidos (AMOROZO, 1996). Questiona-se assim, qual seria a contrapartida a ser oferecida a estas sociedades, e salienta-se a importância de os pesquisadores respeitarem e atribuírem o devido valor ao conhecimento comum e popular, pois dele fazem uso para a execução de suas pesquisas (DI STASI, 1996).

## 1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

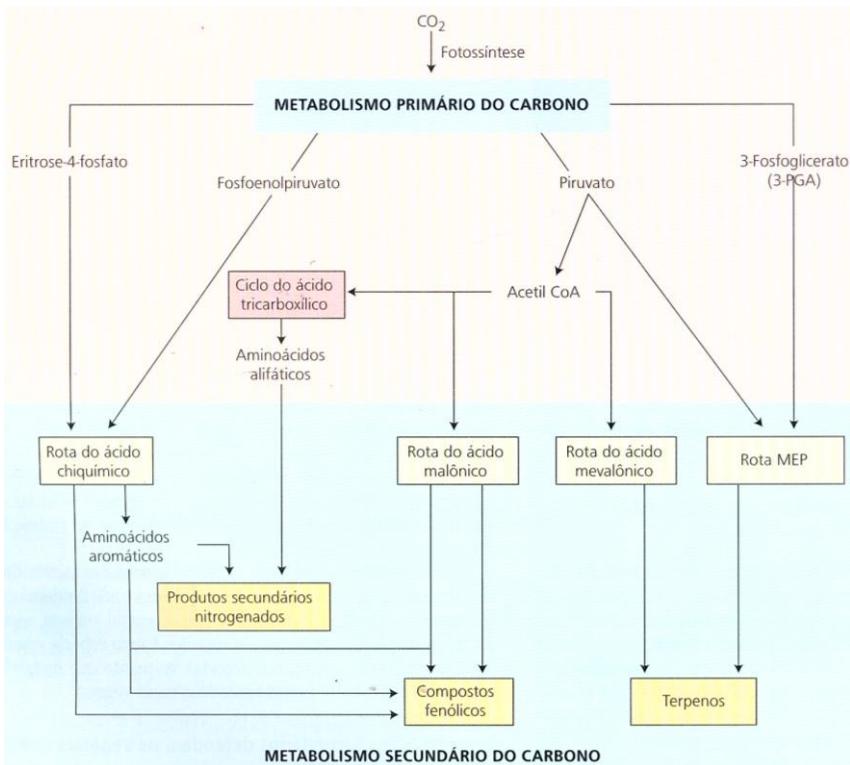
Os metabólitos secundários, também denominados de produtos secundários ou produtos naturais, compreendem uma grande variedade de compostos orgânicos que aparentemente não desempenham função direta no crescimento e desenvolvimento dos vegetais, em processos como a fotossíntese, a respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Estes metabólitos apresentam distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas. Por não participarem de sua economia direta, as quantidades de metabólitos secundários nas plantas não são abundantes e as concentrações acima de 1% são exceções, não regra (BRITO, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Durante muito tempo, a importância adaptativa da maioria dos metabólitos secundários vegetais era desconhecida, considerando-se tais compostos como produtos finais do metabolismo sem função aparente ou mesmo como resíduos. Apenas no século XIX e início do século XX iniciaram-se estudos acerca dessas substâncias. Atualmente, sabe-se que muitos produtos do metabolismo secundário desempenham importantes funções para a sobrevivência e propagação das plantas que os produzem, atuando como sinais químicos que permitem à planta responder a estímulos do ambiente, protegendo-a contra herbívoros, infecção por micro-organismos patogênicos ou radiação solar, ou ainda contribuindo para a dispersão de pólen e sementes (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Uma característica dos vegetais em relação ao metabolismo secundário é a elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à diversidade estrutural em uma mesma espécie. E embora sejam classificadas como fazendo parte do metabolismo primário ou do secundário, as reações bioquímicas não ocorrem independentemente em um mesmo organismo produtor. Alterações no primeiro podem afetar profundamente as reações do segundo. Muitos metabólitos secundários são formados por sequências de reações análogas às do metabolismo primário, o que faz com que a linha divisória entre os dois tipos de metabolismo não seja perfeitamente nítida (SANTOS, 2007).

Os metabólitos secundários vegetais geralmente são classificados em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. A Figura 1 apresenta uma visão simplificada

das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.



**Figura 1. Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário. Fonte: Taiz e Zeiger (2004)**

### 1.2.1 Compostos terpênicos

Os compostos terpênicos constituem o maior grupo de metabólitos secundários conhecidos, tendo sido listados mais de 22.000 destes compostos sintetizados por plantas. As diversas substâncias desta classe são sintetizadas a partir da Acetil CoA ou de intermediários glicolíticos, através da rota do ácido mevalônico ou da rota do metileritritol fosfato. Alguns terpenos, como as giberelinas, os esteróis e os carotenóides, têm função bem caracterizada no crescimento e

desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados como metabólitos primários, entretanto a grande maioria dos compostos terpênicos é produto do metabolismo secundário, relacionando-se com a defesa vegetal (HELDT, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os terpenos ocorrem em todas as plantas. Originam-se da condensação de unidades pentacarbonadas, também chamadas de unidades isoprênicas. O hidrocarboneto isopreno ( $C_5H_8$ ), um gás emitido em grandes quantidades pelas folhas de muitas espécies vegetais, é o composto terpênico mais simples existente. Com exceção do próprio isopreno, os isoprenóides apresentam-se como dímeros, trímeros ou polímeros. Assim, os compostos terpênicos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno que possuem. Os terpenos de 10 carbonos, que possuem duas unidades  $C_5$ , são denominados monoterpênicos; os terpenos com 15 carbonos, que têm três unidades  $C_5$  são os sesquiterpenos e os terpenos de 20 carbonos (quatro unidades  $C_5$ ), são os diterpenos. Os maiores terpenos incluem os triterpenos (30 carbonos), tetraterpenos (40 carbonos) e politerpenóides (mais de 40 carbonos). Uma única planta pode sintetizar muitos compostos terpênicos diferentes, em diferentes órgãos, para uma grande variedade de propósitos e em épocas diferentes, ao longo do seu desenvolvimento (SPONSEL, 1995; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

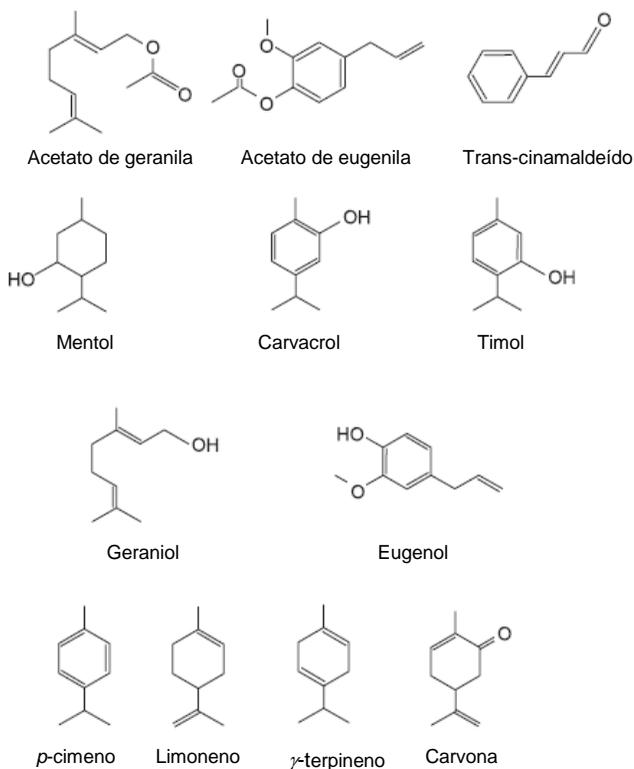
Outra forma de classificação dos compostos terpênicos refere-se à ciclização ou não da cadeia e ao número de anéis na molécula. Assim, também podem ser classificados em acíclicos (cadeia aberta), monocíclicos (um anel), bicíclicos, tricíclicos, etc., podendo ser oligômeros de isopreno e também isômeros saturados ou parcialmente saturados, bem como derivados oxigenados, como alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres e ésteres (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Quanto à nomenclatura, os compostos terpênicos podem ser denominados sistematicamente conforme as normas da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), porém essas denominações são longas e problemáticas. Por esse motivo, costuma-se utilizar nomes simples para denominar os compostos mais comuns (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). A Figura 2 apresenta a fórmula estrutural de alguns compostos terpênicos.

### 1.2.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário que incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas,

que possuem no mínimo um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Constituem um grupo quimicamente e funcionalmente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos conhecidos. Podem ser sintetizados por meio de duas rotas bioquímicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. A maioria dos compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina (rota do ácido chiquímico), através da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico. Em reações subsequentes, são adicionados grupamentos hidroxila e outros substituintes, dando origem a diversos compostos fenólicos simples, os fenilpropanóides. Estes são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos, como os flavonóides, os taninos e a lignina (SALISBURY; ROSS, 1992; TAIZ; ZEIGER, 2004).



**Figura 2. Fórmula estrutural de alguns compostos terpênicos. Fonte: adaptado de Burt (2004).**

Esses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e nos micro-organismos, e também fazem parte do metabolismo animal. Entretanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático, e os compostos fenólicos produzidos em pequena quantidade pelos mesmos utilizam o anel benzênico proveniente de substâncias presentes na dieta alimentar (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Os compostos fenólicos estão quase universalmente presentes nas plantas e acumulam-se em todas as partes dos vegetais (raiz, caule, folhas, flores e frutos). Representam a classe de metabólitos secundários mais estudada, entretanto a função de muitos compostos fenólicos é ainda desconhecida. Dentre as funções desempenhadas por esses compostos heterogêneos, pode-se citar suas ações como pesticidas naturais, antibióticos, sinalizadores para o estabelecimento de relações de simbiose com micro-organismos, atração de insetos polinizadores, proteção contra a radiação ultravioleta, além da função estrutural que dá estabilidade à planta (HELDT, 1997).

Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes primários presentes nas plantas, e considera-se que há uma relação linear entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e as propriedades antioxidantes de uma determinada espécie vegetal (SHYLAJA; PETER, 2004).

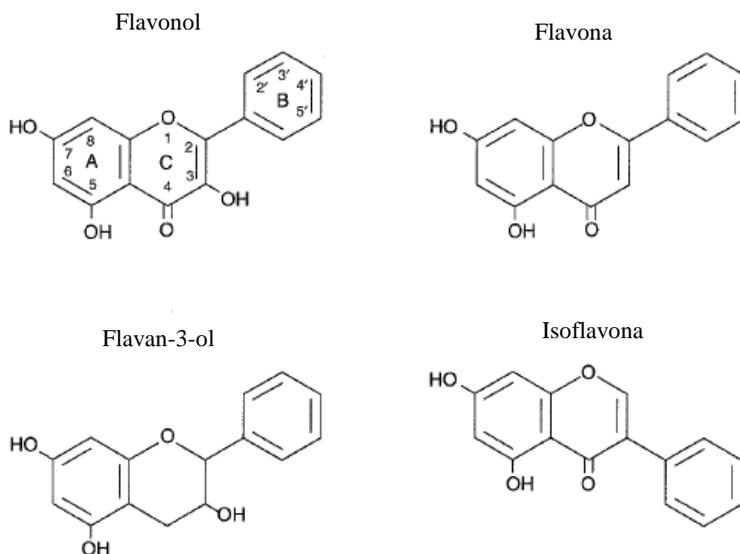
#### 1.2.2.1 Flavonóides

Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos vegetais e são amplamente distribuídos nas plantas, tendo sido identificados mais de 4000 diferentes tipos de flavonóides naturais. O esqueleto de carbono dos flavonóides contém 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia ciclizada de três carbonos. Contêm vários grupamentos hidroxila ligados aos anéis, designados A, B e C (Figura 3). Variações estruturais nos anéis subdividem os flavonóides em quatro grupos: flavonols, flavonas, flavanols (pró-antocianidinas) e isoflavonas. Os flavonóides geralmente ocorrem como glicosídeos, e a glicosilação torna a molécula mais solúvel em água (permitindo seu armazenamento nos vacúolos) e menos reativa frente aos radicais livres (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). No trato digestivo, a aglicona é liberada dos glicosídeos pela ação hidrolítica da microbiota local (TERAO, 1999).

As propriedades dos flavonóides incluem a capacidade de sequestro de radicais livres, acentuada atividade antioxidante na prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), inibição de enzimas hidrolíticas e oxidativas (lipoxigenase,

cicloxygenase, fosfolipase A<sub>2</sub>), além de atividade anti-inflamatória (FRANKEL, 1999). Também tem sido apontada para alguns flavonóides uma atividade na redução do risco de desenvolvimento de câncer (LIN; WENG, 2006).

O interesse econômico pelos flavonóides decorre de alguns deles poderem ser usados como pigmentos naturais, utilização no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá da Índia e na manufatura do cacau, por exemplo. Além disso, conferem cor e valor nutricional a alguns alimentos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).



**Figura 3. Estruturas básicas dos flavonóides. Fonte: adaptado de Rice-Evans, Miller e Paganga (1997)**

Nos vegetais, desempenham diversas funções, incluindo pigmentação e defesa. As antocianinas são pigmentos responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul encontradas em flores, frutas e algumas folhas. As flavonas e os flavonóis estão presentes nas flores e nas folhas de todas as plantas verdes, e atuam na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B. Recentemente, descobriu-se que as flavonas e os flavonóis secretados no solo pelas raízes das leguminosas atuam como mediadores na interação dessas plantas com

micro-organismos simbioses fixadores de nitrogênio. Os isoflavonóides (isoflavonas) apresentam várias atividades biológicas, sendo encontrados principalmente na família das leguminosas. Alguns apresentam potente atividade inseticida; outros possuem ação antiestrogênica e outros, presentes na soja, podem ainda apresentar efeitos anticancerígenos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

### 1.3 EXTRATOS VEGETAIS

A palavra “extrato” deriva do latim *extractus*, que significa “coisa extraída de outra”. A extração pode ser realizada através de diferentes processos, como a infusão, a decocção, a digestão, a maceração e a percolação (OLIVEIRA; AKISUE, 2009). Handa (2008) descreve, além destes métodos, a extração contínua a quente (Soxhlet), a extração hidroalcoólica por fermentação, a extração em contracorrente, a extração por ultrassom, a extração supercrítica e o processo “phytonics”, uma tecnologia patenteada baseada na utilização de hidrofluorocarbono-134a como solvente. Tem-se, assim, uma ampla variedade de métodos para a extração de compostos ativos de plantas, devendo a escolha ser baseada na viabilidade econômica e adequabilidade a cada situação em particular.

As etapas geralmente envolvidas na extração de plantas medicinais são: a) redução de tamanho do material vegetal; b) processo de extração; c) filtração; d) concentração e e) secagem (HANDA, 2008).

A maceração, a percolação e a infusão são os processos geralmente empregados para a extração de plantas medicinais. Seu propósito é a obtenção da porção desejável (ativa) e a eliminação do material inerte através do tratamento com um solvente seletivo. Os processos de extração são afetados por fatores tais como a taxa de transporte do solvente através do material vegetal, a taxa de solubilização dos constituintes e a taxa de transporte da solução para o exterior do material insolúvel. A escolha do processo a ser utilizado para a extração deve levar em conta ainda uma série de fatores, como a natureza do material a ser extraído (tipo de órgãos e tecidos vegetais envolvidos), a estabilidade do material vegetal e seu custo, o solvente a ser utilizado e sua recuperação. No que concerne à maceração, algumas modificações no processo podem resultar em uma maior eficiência de extração, como o emprego de macerações duplas ou triplas, sendo o segundo e terceiro macerados misturados e evaporados antes de serem adicionados ao primeiro (SINGH, 2008).

Diversos métodos de extração e também de estudo de compostos oriundos de plantas têm sido sugeridos pela literatura pertinente. Neste sentido, Cechinel Filho e Yunes (2001) salientam a importância e a necessidade de que os estudos fitoquímicos sejam guiados pelos bioensaios, seja *in vivo* ou *in vitro*, quando o que se busca são compostos bioativos.

Pode-se utilizar diferentes solventes e suas combinações para a preparação de extratos vegetais. Um método considerado adequado para a análise químico-farmacológica é o de extração em solução hidroalcoólica (etanol/água) a fim de obter-se o extrato bruto. No caso de este extrato apresentar atividades biológicas de interesse, pode-se partir para um método sistemático de estudo, em que o metanol, por possibilitar a extração de um maior número de compostos, é indicado como o solvente mais apropriado para a preparação do extrato bruto. Posteriormente, este extrato pode ser submetido a processos de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes. Este processo resultará em uma semi-purificação das diferentes substâncias com base em suas polaridades. Como provável separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas, pode-se citar, nos extratos de (1) hexano: esteróides, terpenos e acetofenonas; (2) diclorometano: lignanas, flavonóides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas; (3) acetato de etila: flavonóides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas, compostos fenólicos em geral e (4) butanol: flavonóides glicosilados, taninos, saponinas e carboidratos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Observa-se que extratos extremamente polares (aquosos) ou extremamente apolares (hexânicos ou etílicos) tendem a apresentar menor atividade biológica do que extratos de polaridade intermediária, como extratos etanólicos, metanólicos ou hidroalcoólicos. Isto se deve a questões de permeabilidade de membrana e metabolismo, em que o balanceamento entre a hidrofiliabilidade e a lipofiliabilidade é importante para a afinidade de substâncias aos receptores biológicos (BRITO, 1996; FERRI, 1996).

Schneider et al. (2011) sugerem a extração de compostos vegetais através de sistemas aquosos de duas fases, utilizando-se surfactantes não iônicos como o Tween<sup>®</sup> 65. Os autores testaram esse sistema na extração dos ácidos oleanólico e ursólico a partir de *Salvia triloba*, e concluíram que tais sistemas permitem a extração de ácidos triterpênicos, com maior grau de pureza do extrato obtido. Além disso, apontam a baixa toxicidade e a biodegradabilidade como vantagens sobre os solventes clássicos.

Comparando a utilização de diferentes solventes (hexano, acetato de etila, e metanol) na preparação de extratos a partir de uma planta medicinal, Babu et al. (2009) verificaram que o extrato metanólico apresentou maior atividade antioxidante que os demais extratos avaliados. O metanol também resultou em extratos com maior atividade antioxidante quando comparado à acetona (70%) na extração de *Camelia sinensis* (chá verde), *Ficus bengalensis* e *F. racemosa* (MANIAN et al., 2008).

Turkmen, Sari e Velioglu (2006) avaliaram o efeito da utilização de água e solventes orgânicos como a acetona, *N, N*- dimetilformamida, etanol e metanol em diferentes concentrações na extração de polifenóis e na atividade antioxidante de chá preto e chá mate, e observaram que, embora não tenham resultado na maior extração de compostos polifenólicos das plantas citadas, a acetona (50%) e o etanol (50%) resultaram na maior atividade antioxidante para o chá preto e para o chá mate, respectivamente. Comparando a utilização de água, metanol, etanol (60%) e acetona (35%), utilizados como solventes em sementes de guaraná, Majhenic, Skerget e Knez (2007), verificaram que o extrato etanólico foi o mais eficiente como agente antioxidante e antimicrobiano. Em outro estudo, comparou-se o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos de uva passa obtidos com a utilização de diferentes solventes (água, metanol, etanol, acetona e a combinação dos três últimos com 20, 40, 60 e 80% de água). O extrato obtido a partir de etanol:água (60:40, v/v) apresentou o maior conteúdo de compostos fenólicos totais, enquanto a combinação 80:20 (v/v) dos mesmos solventes resultou na maior atividade antioxidante observada (ZHAO; CLIFFORD; HALL, 2008).

A grande maioria dos constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam algum grau de solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80%, de modo que estas são frequentemente empregadas. Na escolha de um solvente, além dos fatores relativos à eficiência do processo extrativo, também devem ser considerados fatores tais como a toxicidade e os riscos inerentes à manipulação do solvente, a estabilidade das substâncias extraídas, além do custo e disponibilidade do solvente em questão (FALKEMBERG; SANTOS; SIMÕES, 2007).

Calixto (2001) aponta que, de acordo com vários relatos da literatura e a experiência de seu grupo de pesquisa, para a grande maioria das plantas, a extração a frio com etanol-água (50:50 ou 70:30) por maceração prolongada, possibilita uma extração bastante exaustiva, capaz de extrair diferentes classes de compostos ativos, incluindo

substâncias de diferentes graus de polaridade, o que possibilita a confirmação das propriedades de uma planta durante os testes iniciais.

#### 1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. São considerados misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas à temperatura ambiente. Por algumas de suas características físico-químicas, podem receber outras denominações, como *óleos voláteis* (sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos), *óleos etéreos* (por serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter) ou ainda *essências* (pelo aroma agradável e intenso da maioria desses óleos) (MATTOS et al., 2007; SIMÕES; SPITZER, 2007). O termo essência (do latim *essentia*) pode também referir-se à propriedade especial de algo, o que faz com que algo seja o que é (OLIVEIRA; AKISUE, 2009).

Os principais métodos de extração dos óleos essenciais são o arraste por vapor d'água, a extração com solventes orgânicos, a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico, a prensagem (ou expressão) e a enfloração (*Enfleurage*) (SHYLAJA; PETER, 2004).

Os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes órgãos da planta, como nas folhas, frutos, flores, cascas dos caules, rizomas ou ainda nas sementes. São produzidos por diversas estruturas especializadas, como pêlos glandulares, glândulas, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou bolsas lisígenas ou esquizolisígenas, dependendo da família em que se encontra a espécie em questão (OLIVEIRA; AKISSUE; AKISSUE, 2005; MATTOS et al., 2007; OLIVEIRA; AKISUE, 2009). Os óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais são produzidos em quantidades mínimas, sendo geralmente necessárias várias centenas de quilogramas de planta fresca para se produzir um quilograma de óleo essencial. Por exemplo, para a obtenção de 1 kg de óleo essencial de manjeriço, são necessários 3.000 kg de planta fresca (folhas), correspondendo a cerca de 1.500 m<sup>2</sup> de área de cultivo (GROSSMAN, 2005).

### 1.4.1 Composição dos óleos essenciais

A quase totalidade dos óleos essenciais é constituída por misturas químicas muito complexas. Os componentes químicos dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos sulfurados. Estes compostos ocorrem em diferentes concentrações em um dado óleo essencial, sendo que geralmente um deles é o composto majoritário, chegando a representar 80% ou mais da composição do óleo essencial, existindo outros em menores teores e alguns aparecendo como constituintes-traço (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser agrupados em duas grandes classes, de acordo com a biossíntese que lhes deu origem: (1) derivados de terpenóides, formados através da rota do ácido mevalônico-acetato e (2) compostos aromáticos formados através da rota do ácido chiquímico, os fenilpropanóides. Além da estrutura molecular, a estereoquímica dos componentes dos óleos essenciais é determinante do tipo de resposta olfativa provocada pelos isômeros geométricos. Uma característica interessante de muitos terpenos é o fato de existirem ambos os enantiômeros (isômeros opticamente ativos) na natureza. Em alguns casos, uma espécie de planta produz apenas um dos enantiômeros, enquanto uma espécie diferente pode produzir ambos. Por exemplo, o limoneno, o  $\alpha$ -terpinol, o  $\alpha$ -fenchol, a carvona e a cânfora, dentre outros, podem ser encontrados nas plantas como misturas racêmicas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os derivados terpênicos, especialmente os monoterpenos e os sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais, sendo às vezes inclusive referidos como sinônimos destes (SALISBURY; ROSS, 1994). Foram descritos como componentes de óleos essenciais mais de 150 monoterpenos e 1.000 sesquiterpenos, de um total de mais de 22.000 compostos terpênicos identificados (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A composição do óleo essencial de uma determinada espécie de planta pode variar significativamente, de acordo com uma série de fatores tais como: o quimiotipo (raça química) da planta, a etapa do ciclo vegetativo em que o vegetal se encontra, fatores ambientais como a altitude, a temperatura, a umidade relativa, o tempo de exposição solar, o grau de hidratação do solo, a presença de micronutrientes e até mesmo o regime de ventos a que a planta está submetida (OLIVEIRA;

AKISUE; AKISUE, 2005; MATTOS et al., 2007; OUSSALAH et al., 2007).

#### **1.4.2 Funções e aplicações dos óleos essenciais**

As substâncias presentes no óleo essencial desempenham funções ecológicas importantes para a planta que as secreta, como a proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra a perda de água e inibição da germinação de outras plantas (alelopatia). De fato, algumas plantas inibem o desenvolvimento de outras através da liberação de substâncias químicas, chamados compostos alelopáticos ou aleloquímicos, que incluem compostos fenólicos e terpênicos. Sugere-se que os compostos alelopáticos possam ter evoluído a partir de substâncias que originalmente inibiam patógenos ou herbívoros, e que posteriormente envolveram-se em interações entre plantas superiores. Muitos compostos fenólicos inibem a germinação de sementes, podendo inibir a captura de íons ou a respiração celular, enquanto os terpenos podem inibir a divisão celular (LAMBERS; CHAPIN; PONS, 2008).

Mattos et al. (2007) revisam os resultados de pesquisas desenvolvidas no estado do Ceará, acerca da utilização de óleos essenciais e produtos formulados a base de óleos essenciais emulsionados na proteção de culturas e produtos agrícolas armazenados, descrevendo atividades acaricida, fungicida, nematicida, inseticida e ainda como inibidores da germinação de plantas infestantes.

Algumas propriedades farmacológicas de diversos óleos essenciais já estão bem estabelecidas, como por exemplo as ações carminativa (funcho, erva-doce, coentro, menta), antiespasmódica (camomila, macela), estimulante de secreções do sistema digestório (gingibre), estimulante (óleos essenciais contendo cânfora) ou depressora (melissa, capim-limão) do sistema nervoso central, secretolítica sobre o aparelho respiratório (eucalipto, anis-estrelado), anestésica local (cravo da índia), anti-inflamatória (camomila, salsaão) e anti-séptica, entre outras. Alguns compostos presentes em óleos essenciais, como o citral, o geraniol, o linalol e o timol possuem elevada atividade anti-séptica, superior inclusive à do próprio fenol (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais possuem amplo potencial de aplicação, em áreas como a medicina e a farmacologia, a cosmética, a culinária e a agricultura (MATTOS et al, 2007), podendo ser utilizados como aromatizantes de alimentos e doces, na fabricação de produtos de higiene e limpeza, entre outros (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Nos alimentos, plantas ricas em óleos essenciais são utilizadas a fim de conferir sabor, aroma e pungência, destacando-se ainda propriedades antioxidantes, antimicrobianas e nutricionais. Além dos efeitos diretos, a utilização dessas plantas pode levar a efeitos secundários mais complexos, como a prevenção da deterioração dos alimentos (PETER, 2004).

### 1.5 MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS

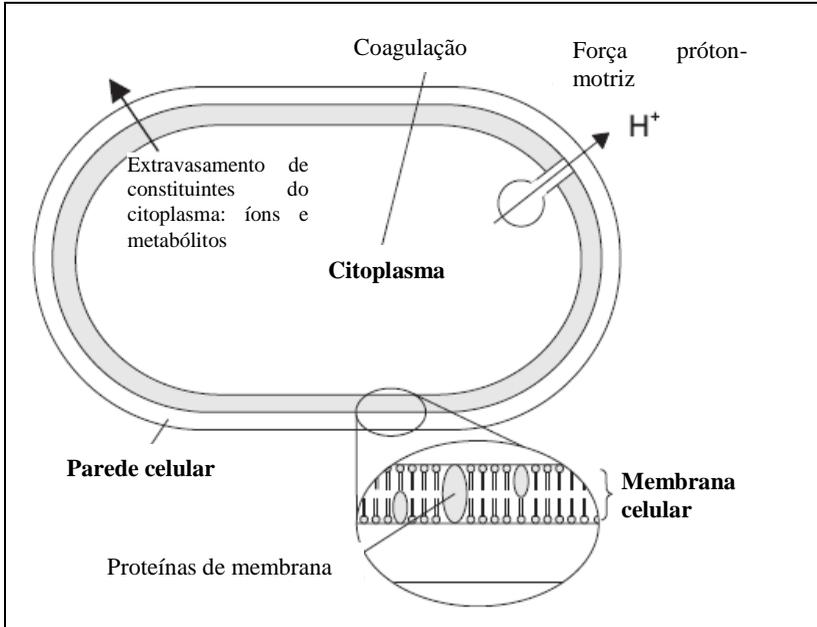
Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (COWAN, 1999; SHYLAJA; PETER, 2004).

Em um estudo acerca da influência do carvacrol (composto ativo presente em muitos óleos essenciais e extratos vegetais), sobre os parâmetros bioenergéticos de células vegetativas de *Bacillus cereus*, Ultee, Kats e Smid (1999) verificaram que este composto reduziu significativamente o *pool* de ATP intracelular, o que foi associado a uma mudança no potencial de membrana. Também observaram um aumento da permeabilidade da membrana a prótons e íons  $K^+$ , o que leva à desestabilização de processos essenciais da célula e finalmente à morte celular. A presença do grupamento hidroxila e de um sistema de elétrons deslocados na molécula de carvacrol parecem ser fatores importantes para a sua atividade antimicrobiana. Agindo como um trocador de cátions (vide mecanismo proposto na Figura 4), reduz o gradiente de pH da célula, causando um colapso na força próton-motriz. Como consequência, não pode mais haver a síntese de ATP, o que pode levar à morte celular (ULTEE; BENNIK; MOEZLAAR, 2002). Em outro trabalho, Ultee e Smid (2001) verificaram que o carvacrol também reduziu a produção de toxina diarreica por *B. cereus in vitro* (0,06 mg/mL) e em sopa de cogumelos (>0,9 mg/mL).



os efeitos inibitórios do óleo essencial são consistentes com a partição dos constituintes monoterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos. Observou-se redução na viabilidade celular, aumento na coloração por iodeto de propídio, perda de material 280 nm absorvente e inibição do consumo de O<sub>2</sub> (inibição da respiração celular) em todos os micro-organismos testados. O efluxo de íons K<sup>+</sup> foi observado em ambas as bactérias avaliadas, indicando a perda do efeito de barreira desempenhado pela membrana celular, que pode levar à morte celular. O iodeto de propídio é um corante fluorescente de ácidos nucleicos capaz de penetrar e corar células cuja membrana celular sofreu danos, porém incapaz de fazê-lo em células íntegras. Em *E. coli*, observou-se um aumento nesta coloração proporcional à redução de células viáveis. Já em *S. aureus*, este aumento não correspondeu à redução na viabilidade celular, melhor indicada, no caso deste micro-organismo, pela perda de íons K<sup>+</sup>. Os autores concluem que o efeito letal do óleo essencial de melaleuca é causado principalmente pela inibição de eventos metabólicos localizados na membrana celular e pela perda do controle quimiosmótico da célula (COX et al., 2001). A Figura 5 apresenta alguns mecanismos de ação reportados para os óleos essenciais e seus componentes e a localização na célula bacteriana. É importante salientar que nem todos os mecanismos atuam separadamente: alguns locais são afetados em consequência de outro previamente atacado (BURT, 2004).

Apostolidis et al. (2008) buscaram avaliar o mecanismo de ação dos compostos fenólicos presentes nos extratos combinados de orégano e arando vermelho e do radical lactato (lactato de sódio) sobre *Listeria monocytogenes*. Partiram da hipótese de que estes poderiam se comportar como análogos da prolina, inibindo a oxidação deste aminoácido pela enzima prolina desidrogenase em nível de membrana, na célula procariótica. Para isto, verificaram o efeito da adição de prolina (1 mM) ao meio de cultura contendo os agentes antimicrobianos, e verificaram que a atividade antimicrobiana dos extratos de orégano e arando vermelho, bem como do lactato de sódio foi significativamente reduzida através da suplementação do meio de cultura com prolina.



**Figura 5.** Alguns mecanismos de ação reportados para os óleos essenciais e seus componentes e sua localização na célula bacteriana. **Fonte: Burt (2004)**

A inibição da atividade enzimática bacteriana também foi identificada como um mecanismo de ação exercido por componentes de óleos essenciais tais como o cinamaldeído, o eugenol e o carvacrol. Gill e Holley (2006) avaliaram a capacidade destes três compostos aromáticos em inibir a atividade da ATPase em membranas isoladas, observando inibição de ATPase em membranas de *E. coli* e *L. monocytogenes* pelos três componentes avaliados.

O alil isotiocianato (AIT), composto derivado de glicosinolatos presentes no óleo essencial de mostarda, no brócolis, couve-flor e raiz forte, entre outras fontes (NIELSEN; RIOS, 2000), também foi avaliado quanto à inibição enzimática. Luciano e Holley (2009) testaram a inibição das enzimas tioredoxina redutase e acetato quinase em *E. coli* O157:H7, e observaram atividade inibitória de tioredoxina redutase mesmo com o menor nível de AIT testado ( $1\mu\text{L/L}$ ), sugerindo que a atividade inibitória desta substância contra *E. coli* pode estar relacionada, pelo menos em parte, à inibição da síntese de DNA. A

enzima acetato quinase foi inibida por concentrações maiores de AIT (10 e 100 $\mu$ L/L), e os autores sugerem que o AIT possivelmente interaja com esta enzima causando uma modificação conformacional, que levaria à inibição catalítica observada.

Outra abordagem referente ao mecanismo de ação antimicrobiana consiste na possível atividade *anti-quorum sensing* desempenhada por plantas e seus componentes. O *quorum-sensing* consiste em um fenômeno de comunicação entre células bacterianas mediado pela densidade celular, em que moléculas sinalizadoras, chamadas autoindutores, são constantemente produzidas e detectadas pelos microorganismos. Com o aumento da população microbiana, há um aumento na concentração destes compostos, o que leva à expressão de determinados genes envolvidos na expressão de fatores de virulência e na formação de biofilmes, por exemplo (ADONIZIO et al., 2006). Estes autores testaram a hipótese de que plantas com uso tradicional medicinal poderiam apresentar tal atividade. Para tanto, avaliaram um conjunto de 50 espécies de plantas medicinais do Sul da Flórida, utilizando como biomonitores as espécies *Chromobacterium violaceum* e *Agrobacterium tumefaciens*, e verificaram que seis espécies vegetais apresentaram atividade *anti-quorum sensing*.

De acordo com Rahman e Kang (2009), o risco de que microorganismos patogênicos venham a desenvolver resistência aos óleos essenciais e extratos vegetais é muito baixo, uma vez que estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam através de diversos mecanismos. Esta é uma característica benéfica e vantajosa dos produtos derivados de plantas sobre outros agentes antimicrobianos, e pode vir a aumentar a segurança alimentar e a vida de prateleira dos alimentos.

## 1.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS

### 1.6.1 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica constitui uma das principais causas de deterioração dos alimentos, causando o aparecimento de odores e sabores desagradáveis, além de reduzir a qualidade nutricional e dar origem a produtos de oxidação potencialmente tóxicos (NAWAR, 2000; OWUSU-APENTEN, 2005).

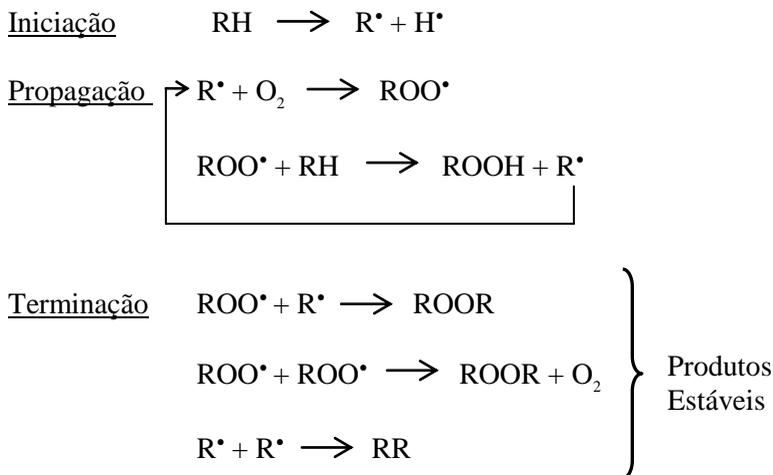
O surgimento de compostos indesejáveis provenientes da oxidação lipídica é um importante problema a ser resolvido a fim de obter-se o aumento da vida útil de óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Os lipídios podem ser oxidados através de diferentes mecanismos: (1) Reações hidrolíticas, catalisadas pela enzima lipase ou pela ação de altas temperaturas e umidade, formando ácidos graxos livres; (2) Oxidação enzimática, em que as enzimas lipoxigenases levam à formação de peróxidos e hidroperóxidos; (3) Foto-oxidação, promovida pela radiação ultravioleta na presença de fotossensibilizadores e (4) Auto-oxidação, reação com o oxigênio molecular via um mecanismo autocatalítico (RAMALHO; JORGE, 2006).

A rancidez de carnes e produtos cárneos costuma ser resultado do processo de auto-oxidação dos ácidos graxos insaturados, sendo os fosfolipídios da gordura da carne os constituintes mais instáveis. Este processo pode ocorrer mesmo em temperaturas tão baixas quanto  $-10^{\circ}\text{C}$ , durante o armazenamento prolongado (LAWRIE, 2005).

Na auto-oxidação, a sequência de reações é tradicionalmente apresentada em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 6). As reações de iniciação dão origem aos primeiros radicais livres, ácidos graxos muito reativos que possuem elétrons não pareados. Esta reação envolve uma forma de oxigênio de alta energia, de vida curta, mas muito reativo, conhecido como oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ). Nas reações de propagação, o oxigênio atmosférico reage com os radicais livres, gerando radicais peróxido. Estes, que também são bastante reativos, seguem reagindo com outros ácidos graxos insaturados, produzindo hidroperóxidos e outros radicais livres. Na etapa final, a terminação, os radicais livres começam a reagir entre si, formando produtos estáveis (COULTATE, 2004).

A velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo. Assim, quanto maior o grau de insaturação do óleo ou da gordura, maior será a susceptibilidade ao processo oxidativo (ARAÚJO, 2001).

A fim de evitar-se a autooxidação de óleos e gorduras, é necessário reduzir a incidência de fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (luz e temperatura), evitando a presença de traços de metais e o contato com o oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres através do emprego de antioxidantes (JORGE; GONÇALVES, 1998).



Onde: RH : Ácido graxo insaturado; R<sup>•</sup> : Radical livre;  
 ROO<sup>•</sup> : Radical peróxido e ROOH : Hidroperóxido

**Figura 6. Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica. Fonte: adaptado de Ramalho e Jorge (2006)**

### 1.6.2 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser classificados como primários e sinérgicos, e estes últimos por sua vez classificam-se em removedores de oxigênio e agentes complexantes. Os removedores de oxigênio, como o ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, sulfito e eritorbatos, reagem com o oxigênio livre, removendo-o de um sistema fechado. Já os agentes complexantes imobilizam íons metálicos pró-oxidantes (como os de ferro e cobre), o que aumenta a energia de ativação das reações iniciais da autooxidação. Exemplos são o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ácido cítrico e derivados do ácido fosfórico (ARAÚJO, 2001).

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio, interrompendo a reação em cadeia. O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim,

formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado pela ressonância do anel aromático, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o butilhidroxitolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA) e a butilhidroxiquinona terciária (TBHQ), classificados como antioxidantes primários (BOZKURT, 2006; NÍCIFOROVÍČ et al., 2010). Entretanto, devido a questões de toxicidade de alguns antioxidantes sintéticos e à preferência dos consumidores por alimentos mais naturais e saudáveis, verifica-se atualmente um interesse crescente na busca por antioxidantes naturais capazes de preservar os alimentos das alterações indesejáveis causadas pelas reações de oxidação e também atuar de forma benéfica sobre a saúde (JAYAPRAKASHA et al., 2004; GACHKAR et al., 2007; OKE et al. 2009; EBRAHIMABADI et al., 2010).

Os antioxidantes sintéticos mais ativos são compostos fenólicos que contêm grupamentos hidroxila orto- ou para- distribuídos no anel benzênico. De modo diferente, os antioxidantes naturais abrangem uma diversidade maior de moléculas: podem ser compostos fenólicos variados, como flavonóides, ácidos fenólicos e taninos, além de carotenóides, tocoferóis ou ácido ascórbico e seus derivados (AMAROWICZA et al., 2004).

As plantas sintetizam compostos antioxidantes, produtos de seu metabolismo secundário, que são principalmente compostos fenólicos que, na planta, participam de mecanismos de defesa contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio. A atividade antioxidante destes compostos fenólicos está relacionada a vários mecanismos, como a captura ou neutralização de radicais livres, a doação de hidrogênio, a inativação do oxigênio singlete, a quelação de íons metálicos, além de atuarem como substrato para radicais superóxido e hidroxil (RICE-EVANS et al., 1995; PIETTA, 2000; NÍCIFOROVÍČ et al., 2010). Desta forma, atuam tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007).

De acordo com Frankel (1999), os antioxidantes fenólicos naturais inibem a oxidação biológica através de um complexo mecanismo em múltiplas etapas. Estes compostos podem participar de diversos mecanismos de defesa antioxidante, desde a prevenção da formação do agente oxidante, a captura de oxidantes ativos, a redução de intermediários reativos, até a indução de sistemas de reparo.

As plantas da família *Lamiaceae* são universalmente aceitas como uma fonte importante de antioxidantes naturais. O alecrim, o orégano, a sálvia, o tomilho, a manjerona e o manjeriço, entre outros, apresentam capacidade antioxidante inclusive superior ao BHT. Fitoconstituintes como o carvacrol, o timol, o ácido rosmarínico e o ácido carnósico são responsáveis por esta atividade antioxidante (SHYLAJA; PETER, 2004).

## 1.7 MICROBIOTA DA CARNE E EMBUTIDOS FRESCAIS

### 1.7.1 Carne fresca

Os micro-organismos encontrados na carne e produtos derivados são provenientes de várias fontes. Como a carne provém de um animal vivo, a maioria da microbiota é composta de micro-organismos encontrados na superfície e/ou no interior do animal. Contudo, as condições ambientais, as operações de processamento, a manipulação e os procedimentos de limpeza e sanificação das instalações têm uma grande influência sobre os tipos e número de micro-organismos encontrados na carne e nos produtos derivados (KINSMAN; BREIDENSTEIN; KOTULA, 1994). De fato, a contaminação externa da carne é uma possibilidade contínua desde o momento da sangria até o seu consumo. No próprio abatedouro há um grande número de fontes potenciais de contaminação, que incluem o couro, o solo aderido a este, o conteúdo gastro-intestinal (se liberado acidentalmente durante a evisceração), a contaminação do ar, da água, dos utensílios utilizados no abate e, finalmente, dos manipuladores (LAWRIE, 2005).

Como a carne geralmente é mantida em ambientes refrigerados, a microbiota de superfície será dominada por organismos capazes de crescer em temperaturas de refrigeração, os chamados micro-organismos psicrotróficos. Estes são bactérias cujo meio primitivo é a água e que chegam à carne através de resíduos de água ou outras sujidades úmidas. De acordo com os gêneros presentes nesta microbiota de contaminação, aponta-se uma associação de *Pseudomonas-Acinetobacter-Moraxella*, bactérias aeróbias estritas (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; JAY, 2005). No gênero *Pseudomonas*, prevalece *Pseudomonas fragi*, considerado como micro-organismo típico da carne (PRÄNDL et al., 1994; LAWRIE, 2005). *Pseudomonas* têm como propriedade geral a capacidade de desenvolverem-se facilmente em alimentos com alto conteúdo protéico e armazenados em baixas temperaturas (FRANCO;

LANDGRAF, 2008). Além dos três gêneros supracitados, *Aeromonas*, *Enterococcus* e *Psychrobacter* estão dentre os mais frequentemente isolados a partir de carnes frescas (JAY, 2005). Os gêneros *Micrococcus* e *Achromobacter* têm sido isolados de carne resfriada apresentando limosidade superficial (LAWRIE, 2005). Outras bactérias estão presentes em pequenas quantidades e ocasionalmente podem ser uma parte importante da microbiota, como *Brochothrix thermosphacta*, que é favorecido por temperaturas de 5°C ou superiores (VARNAM; SUTHERLAND, 1998).

Alguns membros da família *Enterobacteriaceae* têm sido isolados a partir de carne bovina e suína fresca e congelada. Dentre as espécies mais prevalentes estão *Escherichia coli* biotipo 1, *Serratia liquefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *E. hafniae* (JAY, 2005).

O primeiro indício de alteração na carne fresca é a produção de odores desagradáveis, perceptíveis quando o número de micro-organismos existentes alcança um nível em torno de  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>. Neste momento crítico, os micro-organismos passam da utilização de glicose à utilização de aminoácidos como substrato para o seu crescimento. O metabolismo bacteriano origina uma mistura complexa de ésteres voláteis, álcoois, cetonas e compostos sulfurados que conjuntamente produzem os odores desagradáveis detectados. Nas últimas fases de alteração se observa um aumento do pH e são produzidos amoníaco e várias aminas. Quando o número de micro-organismos alcança níveis em torno de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup>, aparece um outro indício de alteração na carne, em forma de uma limosidade superficial (ADAMS; MOSS, 1997).

Dentre os micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos pela carne, figuram *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica (por exemplo o sorotipo O157), *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* e *Bacillus cereus* (ICMSF, 2001). Sofos e Geornaras (2010) citam *Salmonella*, *Campylobacter* e *E. coli* O157:H7 como os principais patógenos a serem controlados na carne fresca. Outros patógenos que podem tornar-se emergentes e importantes em produtos cárneos incluem sorotipos de *E. coli* não O157 produtores de shigatoxina, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia albertii* e *Clostridium difficile*, entre outros (SOFOS, 2008).

O ambiente industrial e seus equipamentos podem permitir a sobrevivência de micro-organismos patogênicos, constituindo fontes

importantes de contaminação da carne. Os biofilmes que alojam patógenos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Yersinia enterocolitica*, podem desenvolver-se rapidamente sobre os equipamentos, podendo atuar como foco de contaminação nas plantas de processamento de carnes, especialmente naquelas com alto grau de automação (BROMBERG, 2002).

Os seguintes gêneros de bolores já foram isolados de carcaças e diversos cortes de carne, sob várias condições de deterioração: *Thamnidium*, *Mucor* e *Rhizopus*, produtores de hifas na carne; *Cladosporium*, que produz pontos escuros ou “manchas negras”, *Penicillium*, que produz “manchas verdes”, e *Sporotrichum* e *Chrysosporium*, produtores de manchas esbranquiçadas na carne. Entre os gêneros de leveduras encontrados em carnes refrigeradas deterioradas, com frequência estão *Candida* e *Rhodotorula*, sendo *C.lipolytica* e *C.zeylanoides* as duas espécies mais abundantes presentes em carne bovina moída (JAY, 2005).

A água e o oxigênio disponíveis bem como o pH são os principais fatores que determinam se a microbiota deteriorante da carne será dominada por bactérias, bolores ou leveduras. Cortes de carne fresca armazenados sob refrigeração, com alta umidade, invariavelmente sofrerão o ataque de bactérias. Os bolores tendem a predominar quando a superfície da carne está ressecada ou o pH é muito baixo para o crescimento bacteriano. Nestas condições, geralmente, a deterioração de produtos cárneos não embalados é causada por bolores e leveduras (KINSMAN; BREIDENSTEIN; KOTULA, 1994).

### **1.7.2 Embutidos frescais**

O regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiças (BRASIL, 2000) define estes produtos como “produto cárneo industrializado, obtido de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, e submetido ao processo tecnológico adequado”. Ainda segundo este regulamento, as linguiças frescais caracterizam-se por apresentar teores máximos de 70% de umidade, 30% de gordura e 0,1% de cálcio (em base seca), e um teor mínimo de 12% de proteína.

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade em nosso país, uma vez que a sua elaboração não exige tecnologia sofisticada, utilizando poucos e baratos equipamentos. Por este motivo, as pequenas agroindústrias geralmente iniciam suas atividades com a fabricação de linguiças. Entretanto, por não serem

submetidas a um tratamento térmico, as linguiças frescas, com elevada atividade de água, apresentam uma elevada carga microbiana e consequentemente uma reduzida vida de prateleira (TERRA, 1998; BROMBERG, 2002).

Os produtos curados de massa grossa (ou linguiças) não fermentados geralmente têm uma maior incidência de contaminação com micro-organismos patógenos e são de qualidade microbiológica inferior aos cortes cárneos. Isto provém de três fatores principais, como: (1) o uso de ingredientes de qualidade inferior, (2) a mistura de uma ampla variedade de ingredientes, o que leva a uma dispersão da contaminação no produto e (3) a liberação de constituintes celulares durante a moagem e as operações subsequentes, proporcionando uma fonte facilmente assimilável de nutrientes. Ao mesmo tempo, a área superficial disponível para o crescimento microbiano é muito maior e os micro-organismos, originalmente sobre a superfície, dispersam-se na carne (VARNAM; SUTHERLAND, 1998).

Quanto ao número e tipo de micro-organismos, pode-se supor que as carnes submetidas a algum tipo de tratamento industrial reflitam a soma do conjunto de seus ingredientes. Além dos componentes cárneos, as linguiças contêm micro-organismos provenientes dos condimentos e dos ingredientes normalmente adicionados durante a produção. Além disso, os envoltórios naturais costumam apresentar elevadas contagens de bactérias, tendo sido isolados *Bacillus* spp., *Clostridium* e *Pseudomonas* a partir destes materiais. Na deterioração de linguiças, *B. thermosphacta* foi considerado como o micro-organismo predominante (JAY, 2005).

Análises microbiológicas realizadas em embutidos frescas têm indicado que uma grande variação no perfil microbiológico pode ocorrer entre produtos provenientes de diferentes fabricantes, principalmente quanto ao número de micro-organismos presentes e a incidência de patógenos. Em muitos casos, esses dados refletem as práticas de higiene adotadas nos abatedouros e a manipulação dos ingredientes. A forma de acondicionamento dos produtos cárneos crus e perecíveis também constitui um fator determinante da microbiota predominante nos mesmos (BROMBERG, 2002)

Apesar da incidência de patógenos ser alta, os embutidos frescas são geralmente seguros, pois são cozidos antes do consumo. Entretanto, as toxinfecções alimentares podem ocorrer pelo consumo do produto insuficientemente cozido ou contaminado após o cozimento. Neste sentido, o risco do cozimento ser inadequado ou insuficiente pode existir em qualquer produto cárneo, o que é evidenciado pela incidência de

toxinfecções causadas por micro-organismos patogênicos tais como *Salmonella* sp e *Escherichia coli* O157:H7 em produtos habitualmente considerados seguros, como salsichas e hambúrgueres (VARNAM; SUTHERLAND, 1998). É importante ressaltar que alimentos submetidos a tratamento térmico, após um período de manutenção em condições que permitam o crescimento de *Staphylococcus aureus*, podem não apresentar células viáveis desse micro-organismo, destruídas pelas altas temperaturas, e ainda assim conter toxinas estafilocócicas termoestáveis (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Nos embutidos frescos curados, o nitrito atua como um agente seletivo no desenvolvimento de micro-organismos. A presença do nitrito confere proteção contra o *Clostridium botulinum*, mas é ineficaz contra bactérias lácticas e enterobactérias. Assim, a microbiota de linguiças frescas será geralmente dominada por enterobactérias, *Pseudomonas*, bactérias lácticas psicrotólicas, enterococos, micrococos e leveduras, que irão ocasionar a sua deterioração (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; BROMBERG, 2002).

O estado microbiológico inicial da carne utilizada na elaboração de produtos derivados é de importância crítica na qualidade microbiológica inicial destes produtos, e, por conseguinte, sobre sua vida útil. Mesmo quando o tempo de geração é longo, se a carga microbiana inicial é alta, será preciso um tempo menor para que se alcance o nível de deterioração. Por isso, medidas higiênicas devem ser estritamente observadas durante todo o processo de produção, desde o abate até a distribuição do produto (IBARRA, 1983; VARNAM; SUTHERLAND, 1998).

## 1.8 APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS

Desde o início de sua existência, o homem tem se defrontado com o problema da deterioração dos alimentos. A conservação dos alimentos tem sido, portanto, uma constante e importante preocupação ao longo da História (PRÄNDL et al., 1994; DEVLIEGHERE et al., 2004).

A conservação da carne envolve a aplicação de medidas para retardar ou prevenir alterações microbiológicas, químicas e/ou físicas que a tornam imprópria para o consumo ou que reduzem alguns aspectos da sua qualidade. Apesar de os vários tipos de alterações serem significativos, a deterioração microbiológica é a mais importante e geralmente precede os outros tipos de deterioração da carne (KINSMAN

et al., 1994). Segundo Ibarra (1983), cerca de 99,9% das alterações da carne são devidas aos micro-organismos.

Dentre os métodos de conservação disponíveis, a indústria alimentícia busca cada vez mais a substituição de métodos tradicionais de conservação, como os tratamentos térmicos intensos, por novas técnicas de preservação, principalmente devido à demanda crescente, por parte dos consumidores, por produtos saborosos, nutritivos, naturais e de conveniência (RAHMAN; KANG, 2009; VIUDA MARTOS et al., 2010a). A segurança da utilização de aditivos químicos também tem sido cada vez mais questionada, como resultado de uma maior preocupação com os riscos à saúde e de uma maior capacidade para avaliar a segurança/toxicidade dos diversos aditivos (BRANEM; DAVIDSON, 1983; DEVLIEGHERE et al., 2004).

Encontra-se, na literatura, várias publicações a respeito da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais (DORMAN; DEANS, 2000; MEJHOLM; DALGAARD, 2002; BURT; REINDERS, 2003; CHORIANOPOULOS et al., 2007; OUSSALAH et al., 2007; RAHMAN; KANG, 2009). A atividade antioxidante destes compostos também tem sido estudada (BOZIN et al., 2007; GACHKAR et al., 2007).

Frequentemente, encontram-se diferenças significativas na atividade antimicrobiana reportada para uma mesma espécie vegetal. Estas diferenças devem-se, principalmente, às diferentes localizações geográficas, época de coleta, genótipo e condições climáticas (OUSSALAH et al., 2007), sendo portanto necessária a caracterização da composição e da atividade de extratos obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

A aplicação de óleos essenciais em alimentos foi revisada recentemente por Holley e Patel (2005) e Burt (2004). De acordo com Gutierrez et al. (2008), a aplicação de óleos essenciais de plantas para o controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes associados a alimentos requer a avaliação do espectro de ação frente aos micro-organismos associados ao alimento em questão, bem como dos efeitos que a própria composição do alimento exercerá sobre esta atividade.

Lemay et al. (2002) apontam que a utilização de óleos essenciais é particularmente viável em produtos cárneos, em função de que ervas e especiarias já são comumente utilizadas nestes produtos a fim de conferir sabores típicos aos mesmos. Desta forma, a adição de óleos essenciais não seria tão limitante quanto o é em outros tipos de alimentos. Estes autores avaliaram a atividade de sete agentes antimicrobianos naturais, dentre eles o óleo essencial de mostarda, o

lactato de sódio, a nisina e misturas comerciais contendo agentes acidificantes, sobre micro-organismos não patogênicos inoculados em uma massa cárnea à base de frango, acidificada e cozida. Verificou-se neste estudo que quando da utilização do óleo essencial de mostarda, aplicado na concentração de 0,1%, as contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e de bactérias lácticas foram significativamente inferiores ao controle após dois dias de armazenamento a 22 °C. Desta forma, os autores consideraram que o óleo essencial de mostarda mostrou-se um dos agentes antimicrobianos naturais mais promissores para a aplicação em produtos cárneos.

Segundo Viuda-Martos et al. (2010b), o óleo essencial de orégano tem aplicação promissora na indústria de alimentos, a fim de aumentar a vida útil de produtos cárneos. Estes autores estudaram o efeito da adição de fibra de laranja e óleo essencial de orégano na mortadela tipo Bologna, e verificaram uma redução nas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e bactérias lácticas no produto. Chouliara et al. (2007), estudando o efeito da adição de óleo essencial de orégano em peito de frango armazenado a 4 °C, verificaram que a aplicação do referido óleo, na concentração de 0,1%, resultou em um aumento de 3-4 dias na vida de prateleira do produto, avaliada sensorialmente.

A atividade antimicrobiana e antioxidante do alecrim também tem sido reportada. Em uma avaliação da aplicação de um extrato comercial de alecrim em linguiça congelada de carne suína, verificou-se que o extrato vegetal foi mais efetivo do que os aditivos BHA e BHT na prevenção da oxidação lipídica (SEBRANEK et al., 2005). Em outro trabalho, a aplicação do alecrim *in natura* em linguiça frescal também resultou em um menor nível de rancificação e menores contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos no produto (LIU et al., 2009).

Careaga et al. (2003), avaliando a atividade antibacteriana de um extrato de pimentão sobre *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa* em carne bovina moída, observaram que a concentração de 1,5% (v/p) do extrato foi capaz de inativar *Salmonella*, enquanto a concentração de 0,3% foi bacteriostática para *P. aeruginosa*.

Buscando avaliar a sobrevivência de *S. aureus* inoculado na massa de um embutido fermentado típico local, Erkmen (2009) verificou que a adição de óleo essencial de *Thymbra spicata* resultou em uma redução na contagem do referido micro-organismo em 1,74 unidades logarítmicas, em comparação ao controle. A contagem total de micro-organismos no produto também sofreu uma redução, de 1,04 unidades logarítmicas.

Busatta et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial de manjerona aplicado em linguça frescal, constatando um efeito bacteriostático sobre *Escherichia coli*, além de uma redução na contagem total de micro-organismos.

Um dos grandes desafios da indústria alimentícia é o controle da contaminação e propagação de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos prontos para o consumo, uma vez que este micro-organismo pode sobreviver no ambiente das plantas de processamento e em temperaturas de refrigeração (MYTLE et al., 2006). Estes autores determinaram o nível de sobrevivência de sete cepas de *L. monocytogenes* inoculadas em diferentes níveis em salsichas de frango tipo frankfurter, armazenadas a 5°C durante duas semanas e a 15°C por uma semana. Os autores também avaliaram o efeito inibitório de óleo essencial de cravo (adicionado a 1 e 2%, v/p) sobre estes micro-organismos. Neste estudo, observou-se que todas as cepas testadas foram capazes de sobreviver e crescer no produto nas temperaturas testadas, mesmo em baixos níveis de inoculação ( $10^2$  -  $10^3$  UFC/g). Entretanto, a adição de óleo essencial de cravo mostrou-se, segundo os autores, uma estratégia efetiva de controle de *L. monocytogenes* em salsicha de frango, uma vez que, mesmo frente a altos níveis de inoculação ( $10^4$  -  $10^6$  UFC/g), o menor nível de óleo essencial testado (1%) foi capaz de reduzir a contagem do micro-organismo em 0,4 - 3,4 log UFC/g, logo após a aplicação do tratamento, conforme a cepa considerada. Ainda segundo os autores, a adição de 1% de óleo essencial de cravo não resultou em uma alteração significativa no aroma, sabor e aceitação geral do produto, em uma avaliação sensorial preliminar.

Apostolidis et al. (2008) buscaram avaliar o efeito da combinação dos extratos de orégano e arando vermelho e lactato de sódio sobre *Listeria monocytogenes*, em caldo e em um modelo de carne moída cozida. Os resultados do estudo indicaram que, em caldo, incubado a 4°C por 20 dias e em pH 6,0, a adição de lactato de sódio a 2% combinado aos extratos vegetais (750 ppm) promoveu uma inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, resultando em uma redução de 2,1 ciclos logarítmicos na contagem deste micro-organismo. Os autores verificaram que, mesmo na ausência de lactato de sódio, a combinação dos dois extratos promoveu uma redução de 1,3 ciclos logarítmicos na contagem de *L. monocytogenes*, em comparação ao controle.

Um aspecto interessante a ser considerado é a possibilidade de redução dos níveis de nitrito adicionados aos embutidos cárneos quando da utilização simultânea com condimentos e especiarias. Kamdem et al.

(2007), não observaram efeitos negativos sobre a coloração de linguiça toscana, nem sobre a contaminação microbiana, quando avaliaram a redução dos níveis de nitrito associada à utilização de uma mistura de condimentos no produto. Os autores também buscaram avaliar a importância da adição de condimentos na prevenção da oxidação lipídica e no crescimento de *Listeria monocytogenes* inoculada no produto. Observaram, ao final do período de armazenamento de 14 dias, que as linguiças adicionadas de condimentos apresentaram níveis inferiores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em comparação ao controle. Com relação ao crescimento de *L. monocytogenes*, observaram que, em condições de abuso de temperatura (armazenamento a 10°C), as linguiças adicionadas de condimentos apresentaram, ao final do período de armazenamento, contagem inferior em 1,2 log UFC/g do referido micro-organismo.

Oliveira et al. (2011) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de segurelha contra *Clostridium perfringens* tipo A inoculado em mortadelas formuladas com diferentes níveis de nitrito de sódio, e observaram um efeito sinérgico entre este óleo essencial (0,78, 1,56 e 3,12%) e o nitrito (100 ppm), sugerindo que a associação entre os dois agentes pode permitir uma redução nos níveis de nitrito utilizados e controlar o desenvolvimento de *C. perfringens* neste produto.

## 2 REFERÊNCIAS

ADONIZIO, A. L. et al. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 427-435, 2006.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza : Acribia, 1997, 464 p. ADONIZIO, A.L. et al. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 427-435, 2006.

ALTEKRUSE, S. F., COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, p. 285–293, 1997.

AMAROWICZA, R. et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.

AMOROZO, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1995. 230 p.

APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y.-I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food microbiology**, v. 128, p. 317-324, 2008.

ARAÚJO, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e Prática. 2ª ed. Viçosa: Ed. UFV, 2001. 415 p.

BABU, A. V. et al. Biological activity of *Merremia emarginata* crude extracts in different solvents. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 4, p. 134-140, 2009.

BAKOS, M. M. **Fatos e mitos do antigo Egito**. 2ª Ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2001. 187 p.

BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7879-7885, 2007.

BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. **Meat Science**, v. 73, n. 3, p. 442-450, 2006.

BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M. **Antimicrobials in foods**. New York : Marcel Dekker, Inc., 1983, 465 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: Brasília, 05 abr. 2000, seção I, p. 6-10.

BRITO, A. R. M. S. Farmacologia de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230 p.

BROMBERG, R. Microbiologia de Produtos Embutidos. In: LEMOS, A.L.S.C.; YAMADA, E.A. **Princípios do Processamento de Embutidos Cárneos**. Campinas : CTC/ITAL, 2002. 164 p.

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

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antimicrobial activity selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 162–167, 2003.

BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207–211, 2008.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó : Argos, 2001. 500 p.

CAREAGA, M. et al. Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 331- 335, 2003.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos Fenólicos Simples e Heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS; Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2007. 1102 p.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó : Argos, 2001. 500 p.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential oils of satureja, origanum, and thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 C. **Food Microbiology**, v. 24, p. 607–617, 2007.

COULTATE, T. P. **Alimentos – A química dos seus componentes**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368 p.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 564-582, 1999.

COX, S. D. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies; possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230 p.

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

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

ELIZABETSKY, E.; de SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 1102 p.

ERKMEN, O. Survival of *Staphylococcus aureus* and aerobic bacteria in sucuks made from starter cultures and *Thymbra spicata* during manufacture and storage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 62-67, 2009.

FALKEMBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 1102 p.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230 p.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008, 196 p.

FRANKEL, E. N. Natural phenolic antioxidants and their impact on health. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999. 511 p.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 170-174, 2006.

GROSSMAN, L. **Óleos essenciais: na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo: Optionline, 2005. 301 p.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91-97, 2008.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HANAMANTHAGOUDA, M. S. et al. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 118, p. 836-839, 2010.

HANDA, S. S. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: HANDA, S. S. et al. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste : United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS - UNIDO), 2008. 260 p.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HELDT, H. **Plant Biochemistry and Molecular Biology**. Oxford: Oxford University Press, 1997, 522 p.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273–292, 2005.

IBARRA, P. **Meat Processing for Small and Medium Scale Operations**. University of the Philippines at Los Baños, 1983, 418 p.

ICMSF. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganismos de los Alimentos 6. Ecología microbiana de los productos alimentarios**. Zaragoza : Acribia, 2001, 593 p.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª Ed. Tradução de Eduardo Cesar Tondo [et al.]. Porto Alegre : Artmed, 2005, 711 p.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activities of flavin in different in vitro model systems. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5141-5146, 2004.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 40-47, 1998.

KAILEH, M. et al. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 113, p. 510-516, 2007.

KAMDEM, S. S.; PATRIGNANI, F.; GUERZONI, M. E. Shelf-life and safety characteristics of Italian Toscana traditional fresh sausage (Salsiccia) combining two commercial ready-to-use additives and spices. **Food Control**, v. 18, p. 421–429, 2007.

KINSMAN, D. M.; BREIDENSTEIN, B. C.; KOTULA, A. W. **Muscle Foods**. New York : Chapman & Hall, Inc., 1994, 573 p.

LAMBERS, H; CHAPIN III, F. S; PONS, T. L. **Plant Physiological ecology**. 2ª Ed. New York: Springer, 2008. 604 p.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**, 6ª ed. Tradução de Jane Maria Rubensam. Porto Alegre : Artmed, 2005, 384 p.

LEMAY, M. et al. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 217 – 226, 2002.

LIN, J.; WENG, M. Flavonoids as nutraceuticals. In: GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. New York: Springer, 2006, 280 p.

LIU, D. et al. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 117, p. 106–113, 2009.

LUCIANO, F.; HOLLEY, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 240-245, 2009.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MANIAN, R. et al. The antioxidant activity and free-radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1000-1007, 2008.

MATTOS, S. H. et al. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza; Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 108 p.

MEJHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effects of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 27–31, 2002.

MILITELLO, M. et al. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1274-1281, 2011.

MYTLE, N. et al. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**, v. 17, p. 102 – 107, 2006.

NAWAR, W. W. Lípidos. In: FENNEMA, O. **Química de los alimentos**, 2ª Ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 1258 p.

NÍCIFOROVÍC, N. et al. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3125-3130, 2010.

NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Microbiology**, v. 60, p. 219-229, 2000.

OKE, F. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, v. 112, p. 874-879, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal**. 3ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2009. 228 p.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 2005. 412 p.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 546-555, 2011.

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

OWUSU-APENTEN, R. K. **Introduction to Food Chemistry**. Washington, D.C.: CRC Press, 2005. 249 p.

PAPAS, A. M. Oil-soluble antioxidants in foods. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, p. 123-149, 1993.

PETER, K. V. (Ed.). **Handbook of herbs and spices**. v.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. 360 p.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRÄNDL, O. et al. **Tecnologia e Higiene de la Carne**. Zaragoza : Acribia, 1994, 854 p.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. Zaragoza : Acribia, 1994, 581 p.

RAHMAN, A.; KANG, S. inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176–189, 2009.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 830 p.

RICE-EVANS, C. A. et al. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, p. 375-383, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

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

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant physiology**. 4ª Ed. Belmont: Wadsworth Inc., 1994. 682p.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 1102 p.

SCHNEIDER, P. et al. Plant extraction with aqueous two-phase systems. **Chemical Engineering & Technology**, v. 34, n. 3, p. 452-458, 2011.

SEBRANEK, J. G. et al. Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. **Meat Science**, v. 69, p. 289-296, 2005.

SHYLAJA. M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 360 p.

SILVA JUNIOR, A. A. *Essentia herba – Plantas bioativas*. Florianópolis: Epagri, 2003, 441 p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS; Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2007. 1102 p.

SINGH, J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. In: HANDA, S.S. et al. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS - UNIDO), 2008. 260 p.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v. 78, p. 3–13, 2008.

SOFOS, J. N. GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 2 - 14, 2010.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPONSEL, V. M. The Biosynthesis and metabolism of Gibberelins in Higher Plants. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. 2<sup>nd</sup> ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, 833 p.

SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 2008. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/alimentos/](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/)>. Acesso em: 22/06/2009.

TAIZ, L.; ZEIGERT, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TERAO, J. Dietary flavonoids as plasma antioxidants on lipid peroxidation: significance of metabolic conversion. In: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant Food Supplements in Human Health**. San Diego: Academic Press, 1999. 511 p.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1998, 216 p.

TERRA N. N.; BRUM M. A. R. **Carne e seus derivados: Técnicas de controle de qualidade**. São Paulo : Nobel, 1988. 119 p.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835-841, 2006.

ULTEE, A.; KATS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 65 n. 10, p. 4606–4610, 1999.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 373-378, 2001.

ULTEE, A.; BENNIK, 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**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos carnicos - Tecnologia, Química y Microbiología**. Zaragoza : Acribia, 1998, 423 p.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9063-9070, 2010a.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. **Food Control**, v. 21, p. 436–443, 2010b.

ZHAO, B.; HALL, C.A. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. **Food Chemistry**, v. 108, p. 511-518, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS; Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2007. 1102 p.



## **CAPÍTULO 2**

# **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS SELECIONADAS CULTIVADAS NO SUL DO BRASIL CONTRA MICRO- ORGANISMOS PATOGÊNICOS E DETERIORANTES DE ALIMENTOS**



# COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS SELECIONADAS CULTIVADAS NO SUL DO BRASIL CONTRA MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS E DETERIORANTES DE ALIMENTOS

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar a composição química de 10 óleos essenciais obtidos por destilação a vapor e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* frente a 12 espécies de bactérias de importância em alimentos. A composição química foi determinada por CG/DIC e CG/EM. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi detectada através do método de difusão em disco. A CMI e CMB foram determinadas para os óleos mais ativos pelo método de microdiluição. Os óleos essenciais que apresentaram maior atividade e espectro de ação contra as bactérias testadas foram os de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare*), louro (*Laurus nobilis*) e da folha de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). O capim-limão apresentou valores de CMI e CMB de 0,62 mg/mL contra *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, e de 1,25mg/mL contra *Salmonella* Typhimurium. *O. basilicum* apresentou CMI e CMB contra *Yersinia enterocolitica* de 0,075 e 0,15 mg/mL, respectivamente. Foi detectada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de monoterpenos oxigenados dos óleos essenciais e os valores de CMI e CMB contra *E. coli*. Os resultados demonstram que os óleos essenciais avaliados apresentam potencial significativo como agentes antimicrobianos naturais para alimentos.

**Palavras-chave:** óleos essenciais, atividade antibacteriana, composição química.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the chemical composition of 10 selected plant essential oils obtained by steam distillation and to evaluate their antimicrobial activity against 12 important food-related bacterial strains. The chemical composition of the essential oils was

determined by GC and GC/MS. The antimicrobial activity was screened by disc-diffusion assay. CMI and CMB for the most active essential oils were determined by microdilution. The most active essential oils against the tested bacteria were lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*), basil (*Ocimum basilicum*), oregano (*Origanum vulgare*), laurel (*Laurus nobilis*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) leaf essential oil. Lemongrass presented CMI and CMB values of 0.62 mg/mL against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, and 1.25mg/mL against *Salmonella Typhimurium*. *O. basilicum* presented CMI and CMB of 0.075 and 0.15 mg/mL, respectively, against *Yersinia enterocolitica*. There was a significant correlation ( $p<0.05$ ) between the level of oxygenated monoterpenes in the essential oils and CMI and CMB values against *E. coli*. Results showed that the evaluated essential oils present high potential as natural food preservatives.

**Keywords:** essential oils, antibacterial activity, chemical composition.

## 1 INTRODUÇÃO

Verifica-se nos últimos anos uma preocupação considerável com relação ao aumento da incidência de doenças transmitidas por alimentos, que vem constituindo um relevante aspecto de saúde pública (OUSSALAH et al., 2007). De fato, um dos maiores desafios recorrentes para a indústria de alimentos é o controle da contaminação microbiana de alimentos crus e processados, a fim de prevenir sua deterioração e evitar a disseminação de patógenos através da cadeia de processamento e distribuição de alimentos. Apesar dos avanços nos serviços de inspeção e técnicas de sanificação, o acesso de micro-organismos indesejáveis aos alimentos constitui um risco eminente durante a produção, industrialização, armazenamento e distribuição, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (RUNYORO et al., 2010). Assim, frequentemente são requeridas novas estratégias a fim de inativar micro-organismos patogênicos em alimentos, buscando o suprimento de alimentos seguros à população.

Nos últimos anos, a utilização de conservantes naturais em alimentos tem encontrado grande aceitação perante o mercado consumidor, que busca cada vez mais produtos naturais, benéficos à saúde, juntamente à redução do consumo de aditivos sintéticos. Produtos naturais de plantas, em particular os óleos essenciais, têm sido indicados

como alternativas promissoras para inativar patógenos em alimentos (CHORIANOPOULOS et al., 2004; RAHMAN; KANG, 2009; EBRAHIMABADI et al., 2010). Os óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de plantas com composição rica em derivados isoprenícos ou fenilpropanóides (RAHMAN; KANG, 2009).

Frequentemente, encontram-se diferenças significativas na atividade antimicrobiana reportada para óleos essenciais provenientes de uma mesma espécie vegetal. Estas diferenças devem-se, principalmente, às diferentes localizações geográficas, época de coleta, genótipo e condições climáticas (CELIKITAS et al., 2007; OUSSALAH et al., 2007), sendo portanto necessária a caracterização da composição e da atividade biológica de óleos essenciais obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

O objetivo deste estudo foi determinar a composição química de óleos essenciais obtidos de 10 espécies de plantas cultivadas na região Sul do Brasil e avaliar a atividade antimicrobiana frente a 12 espécies de bactérias de importância em alimentos, visando a identificação das espécies mais promissoras para a aplicação na indústria de alimentos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram avaliados os óleos essenciais das seguintes espécies vegetais: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), capim-limão (*Cymbopogon winterianus*), funcho (*Foeniculum vulgare*), laranja (*Citrus sinensis*), louro (*Laurus nobilis*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), menta (*Mentha arvensis*), orégano (*Origanum vulgare*) e poejo (*Mentha pulegium*).

O material vegetal foi coletado na cidade de Concórdia – SC, Brasil (27°14' 2" S, 52°1'40" W), no período de setembro de 2009 a janeiro de 2010. A identificação botânica das espécies vegetais foi realizada pelo Dr. A. Jasper (Univates, RS, Brasil) e pelos Drs. S. J. Longhi, M. C. Scipioni e A. R. T. Nascimento (UFSM, RS, Brasil). As exsiccatas das espécies vegetais (Tabela 1) foram depositadas no Herbário do Museu de Ciências Naturais do Departamento de Botânica e Paleobotânica (Univates) e no Herbário Florestal do Laboratório de Dendrologia do Departamento de Ciências Florestais (UFSM).

**Tabela 1. Identificação das espécies vegetais, registro, data de coleta e parte utilizada para a obtenção dos óleos essenciais**

Nome comum	Nome científico	Registro <sup>a</sup>	Data de coleta	Parte utilizada <sup>b</sup>
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	HVAT 2600	18/09/2009	F
Canela	<i>Cinnamomun zeylanicum</i> Blume	HDCF 5538	28/10/2009	F
Capim-limão	<i>Cymbopogon flexuosus</i> (DC) Stapf	HVAT 2613	18/12/2009	F
Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill	HVAT 2610	19/11/2009	F/SF
Laranja	<i>Citrus sinensis</i>	HVAT 2613	24/09/2009	F
Louro	<i>Laurus nobilis</i> L.	HDCF 5536	27/10/2009	F
Manjeriçã	<i>Ocimum basilicum</i> L.	HVAT 2603	14/01/2010	F/SF
Menta	<i>Mentha arvensis</i> L.	HVAT 2602	11/01/2010	F/SF
Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	HVAT 2614	16/12/2009	F
Poejo	<i>Mentha pulegium</i> L.	HVAT 2611	30/10/2009	F
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	HVAT 2600	18/09/2009	F

<sup>a</sup> HVAT: Herbário do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES (Lajeado, RS); HDCF: Herbário Florestal do Laboratório de Dendrologia da UFSM (Santa Maria, RS); <sup>b</sup> F: folha; SF: sumidade florida

Os óleos essenciais foram extraídos a partir das partes aéreas das plantas pelo processo de destilação a vapor, utilizando-se um equipamento em escala-piloto fabricado em aço inoxidável. Inicialmente, cerca de 5 Kg do material vegetal fresco foram acondicionados no sistema de extração. Então, o vapor foi gerado e conduzido através do material vegetal para liberação do conteúdo aromático. Ao final, o vapor foi condensado, para render o hidrolato e o respectivo óleo essencial. O conteúdo condensado foi reunido e transferido para funil de separação, onde o óleo essencial foi prontamente obtido pela separação espontânea das fases. A fase superior foi coletada em tubo de Falcon de 50 mL contendo 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 5 °C. O óleo obtido como um líquido límpido foi transferido para frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

## 2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Em balão volumétrico de 10 mL, 100 µL do óleo essencial foram dissolvidos em diclorometano SupraSolv (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Uma alíquota de 2 mL desta solução de óleo essencial 1% foi transferida para frasco de 2 mL e armazenada sob refrigeração.

## 2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG/DIC)

A solução da amostra foi analisada pela injeção de 1 µL em um cromatógrafo CG Varian CP-3800 (Walnut Creek, CA, USA), equipado com injetor split/splitless (razão 1:10), uma coluna capilar Rtx-5MS com 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA), um detector de ionização de chama (FID) e um amostrador automático Varian CP 8410 (Walnut Creek, CA, USA). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 50 °C por 2 minutos, aumento na razão de 2 °C/minuto até 220 °C, onde permaneceu por 3 minutos. Temperatura do injetor: 240 °C. Temperatura do detector: 240 °C. Nitrogênio N-50 (Alphagaz, V. Carioca, SP, BR) foi usado como gás de arraste a 1,2 mL/min. A quantificação foi realizada por normalização de área, sendo que foram considerados somente os picos maiores de 0,15%. As análises foram realizadas em triplicata. As análises foram realizadas sob as mesmas condições com uma coluna capilar Rtx-WAX de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA).

Para o cálculo dos índices de retenção, injetou-se uma amostra padrão de solução de hidrocarbonetos *C7-C30 Saturated Alkanes Std* (Supelco analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), os quais foram analisados com a mesma programação do equipamento que as amostras. A partir dos resultados dos tempos de retenção das substâncias desta amostra padrão, calculou-se o índice de retenção (IR) de cada substância utilizando-se a fórmula de Van den Dool e Kratz:

$$IR = 100n + \frac{100(T_x - T_n)}{T_{n+1} - T_n}$$

Onde:  $T_n$  e  $T_{n+1}$  são os tempos de retenção dos n-alcenos de referência;  
 $n$  é o número de carbonos do n-alceno de referência;  
 $T_x$  é o tempo de retenção da substância de interesse.

## 2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

A solução da amostra foi analisada pela injeção de 1 µL em um cromatógrafo CG 2010 SHIMADZU (Tóquio, Japão), equipado com injetor split/splitless (razão 1:10), uma coluna capilar Rtx-5MS 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas CGMS-QP 2010 SHIMADZU (Tóquio, Japão). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 50 °C por 2 minutos, aumento na razão de 2 °C/minuto até 220 °C, onde permaneceu por 3 minutos. A temperatura do injetor, da fonte de íons e da interface foram de 240 °C, 200 °C e 220 °C, respectivamente. Hélio Ultra Puro (Linde Gás, Jundiaí, SP, BR) foi usado como gás de arraste, a 1,2 mL/minuto. O espectrômetro de massas foi operado no modo *scan*, ionização por impacto eletrônico a 70 eV, com intervalo de varredura na faixa de m/z 35-350 u.m.a., em ciclos de 0,5 s. A identificação dos picos foi feita com o auxílio da biblioteca informatizada de espectros de massas (NIST 05) e sequência de eluição. As análises foram realizadas sob as mesmas condições com uma coluna capilar Rtx-WAX de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 2.5.1 Culturas bacterianas

Os óleos essenciais foram testados frente a 12 espécies de bactérias, sendo seis espécies Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633) e seis espécies Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610).

As cepas foram mantidas a -20°C nos meios de cultura apropriados adicionados de 10% de glicerol e, durante os ensaios, foram repicadas a cada 15 dias para tubos inclinados de ágar triptose de soja (TSA), mantidos a 4°C.

### 2.5.2 Detecção da atividade antimicrobiana – ensaio de difusão em disco

A detecção de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre as bactérias testadas foi realizada através do método de difusão em disco (CLSI, 2009a), com a seguinte modificação: com exceção de *L. plantarum*, que foi inoculado a partir de uma suspensão de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, foram utilizadas suspensões de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL para inocular as placas de ágar. Resumidamente, as culturas em TSA foram repicadas para ágar sangue e incubadas a 35°C por 12-18h, a fim de verificar-se a morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir destas placas, tomou-se de 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35°C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente  $10^7$  UFC/ml, em solução salina, e esta suspensão foi utilizada para inocular placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, utilizando-se *swab* estéril.

Os discos de papel filtro estéreis (9 mm de diâmetro e 250 g/m<sup>2</sup>) foram impregnados com 25µL de óleo essencial e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a 36°C por 18-24 h. Discos comerciais de ampicilina (10 µg/disco) e cloranfenicol (30 µg/disco) foram utilizados como controles positivos. O diâmetro da zona de inibição foi medido, em milímetros, e a inibição foi classificada em forte, moderada ou fraca conforme Carovic-Stanko et al. (2010). O ensaio foi realizado em quadruplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

### 2.5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Os óleos essenciais que se mostraram mais ativos no ensaio de difusão em disco, ou que se destacaram por apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas, foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI), através do método de microdiluição (CLSI, 2009b), com modificações.

Foram testadas 6 espécies de bactérias, três Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Bacillus cereus* ATCC 11778) e três Gram-negativas

(*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610). O inóculo foi preparado conforme descrito no item 2.4.2.

Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). A pureza das suspensões de inóculo foi verificada através da inoculação simultânea em ágar não seletivo. As placas foram incubadas a 36°C por 18h e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento microbiano (SMÂNIA JR. et al., 1995).

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada com base na metodologia proposta por Celiktas et al. (2007), a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10µL) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36°C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada óleo essencial que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no teste de difusão em disco foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ) para cada espécie de bactéria, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman ( $p < 0,05$ ) entre os principais grupos de componentes identificados nos óleos essenciais (monoterpenos hidrocarbonados, monoterpenos

oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonados e sesquiterpenos oxigenados) e as áreas de inibição para cada espécie bacteriana, assim como entre os grupos de componentes e os valores de CMI e CMB obtidos para cada espécie, utilizando-se o procedimento CORR do pacote estatístico SAS (SAS, 2003).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A Tabela 2 apresenta os constituintes dos óleos essenciais avaliados, determinados por cromatografia gasosa (CG-DIC e CG-EM). Neste estudo, foi possível identificar 89 compostos, que representaram de 81,41 a 99,41% da composição dos óleos voláteis.

Os óleos essenciais de canela (*C. zeylanicum*), laranja (*C. sinensis*) e orégano (*O. vulgare*) apresentaram composição rica em monoterpenos hidrocarbonados (51,41%, 71,52% e 81,25%, respectivamente). No óleo volátil de canela, apesar da predominância de monoterpenos hidrocarbonados, o constituinte majoritário foi o composto oxigenado 1,8-cineol (22,64%), seguido dos compostos *o*-cimeno (19,35%),  $\alpha$ -felandreno (9,98%) e  $\alpha$ -pineno (5,24%). Este óleo ainda apresentou o maior conteúdo de sesquiterpenos oxigenados (6,01%). A maioria dos estudos a respeito da composição química da canela utilizam a casca da árvore para a extração do óleo essencial. Wang et al. (2009), avaliando a composição do óleo essencial extraído das folhas da canela, detectaram o eugenol (79,7%) como composto majoritário.

A amostra extraída das folhas de laranja foi caracterizada pelo alto teor de sabineno (47,72%). Em menor quantidade, porém em níveis consideráveis, foram identificados o (*E*)- $\beta$ -ocimeno (6,33%),  $\delta$ -3-careno (5,14%), D-limoneno (4,88%) e  $\beta$ -mirceno (3,19%). Na fração de monoterpenos oxigenados (21,72%), destacou-se a presença do linalol (7,66%) e do citronelal (5,46%). Em estudos reportados na literatura, diferentemente do presente estudo, o óleo essencial de *Citrus sinensis* foi extraído da casca da fruta, e o composto majoritário nestes casos foi o limoneno, perfazendo até 85% da composição do óleo (ESPINA et al., 2011).

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos)**

Composto <sup>a</sup>	IRE <sup>b</sup>	Alecrim	Canela	Capim-limão	Funcho	Laranja	Louro	Manjeriço	Menta	Orégano	Poejo
$\alpha$ -Tujeno	923	0,37	2,28	-	-	0,25	0,35	-	-	0,90	0,47
$\alpha$ -Pineno	929	9,85	5,24	-	5,07	1,08	3,07	1,10	0,32	0,35	0,20
Canfeno	943	4,66	0,42	-	-	-	-	0,89	-	-	-
Sabineno	970	-	3,28	-	0,22	47,72	9,45	0,95	0,23	4,27	0,34
$\beta$ -Pineno	972	6,99	2,19	-	0,55	0,15	2,81	1,86	0,39	0,34	0,20
1-Octen-3-ol	981	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Octanona	984	-	-	-	-	-	-	-	-	0,18	-
$\beta$ -Miraceno	990	12,50	2,61	8,79	0,90	3,19	1,21	1,00	0,42	2,42	-
$\alpha$ -Felandreno	1003	0,26	9,98	-	1,87	0,52	-	-	-	0,14	-
$\delta$ -3-Careno	1009	-	-	-	-	5,14	0,36	-	-	-	-
$\delta$ -4-Careno	1014	0,70	-	-	-	-	0,24	-	-	1,83	-
<i>o</i> -Cimeno	1022	0,74	19,35	-	0,52	-	-	-	-	11,43	-
(+)-Silvestreno	1026	-	-	-	-	-	1,52	-	-	-	-
D-Limoneno	1026	3,57	1,87	-	2,27	4,88	-	1,75	1,45	-	-
1,8-Cineol	1028	14,24	22,64	-	-	-	35,50	16,42	-	-	-
( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1038	-	-	-	0,15	0,24	-	-	-	16,03	-
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1047	-	1,66	-	-	6,33	0,33	0,31	-	11,68	-
$\gamma$ -Terpineno	1056	2,45	0,52	-	-	0,73	0,55	0,21	-	31,68	-

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos) (continuação)**

Composto <sup>a</sup>	IRE <sup>b</sup>	Alecrim	Canela	Capim-limão	Funcho	Laranja	Louro	Manjeriço	Menta	Orégano	Poejo
2-Metilbutil-butirato	1056	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,16
<i>cis</i> -Sabineno hidratado	1067	-	-	-	-	0,18	0,30	0,34	-	-	0,13
L-Fenchona	1086	-	-	-	1,35	-	-	1,50	-	-	-
$\alpha$ -Terpinoleno	1086	1,00	2,01	-	-	1,29	0,22	-	-	-	-
$\beta$ -Terpineol	1099	0,14	-	-	-	-	0,29	-	-	-	-
Linalol	1102	0,99	1,46	1,04	-	7,66	14,10	35,57	0,40	-	0,37
Cânfora	1141	24,02	-	-	-	-	-	9,98	-	-	-
<i>p</i> -Mentan-3-ona	1152	-	-	-	-	-	-	-	3,44	-	3,64
Citronelal	1153	-	-	0,17	-	5,46	-	-	-	-	-
Pinocarvona	1160	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isomentona	1163	-	-	-	-	-	-	-	1,53	-	5,61
Isomentol	1165	-	-	-	-	-	-	-	1,84	-	9,37
Borneol	1165	1,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pinocanfona	1172	0,49	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentol	1175	-	-	-	-	-	-	-	86,05	-	0,17
Terpinen-4-ol	1176	0,83	1,12	-	-	0,60	0,93	0,46	-	-	0,40
Neoisomentol	1190	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,74
$\alpha$ -Terpineol	1191	1,31	2,17	-	-	0,20	2,78	2,05	-	-	0,46
2-Pinen-10-ol	1197	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos) (continuação)**

Composto <sup>a</sup>	IRE <sup>b</sup>	Alecrim	Canela	Capim-limão	Funcho	Laranja	Louro	Manjerição	Menta	Orégano	Poejo
Estragol	1198	-	-	-	3,10	-	-	-	-	-	-
Acetato de sabinila	1202	-	1,09	-	0,22	-	-	-	-	-	-
Decanal	1207	-	-	-	-	0,23	-	-	-	-	-
Verbenona	1209	2,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nerol	1231	-	-	-	-	-	0,18	-	-	-	-
Timol metil éter	1236	-	-	-	-	-	-	-	-	1,88	-
Neral	1238	-	-	28,46	-	2,61	-	-	-	-	-
Carvona	1244	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13
Timol metil éster	1245	-	-	-	-	-	-	-	-	2,50	-
Geraniol	1259	-	-	3,20	-	-	-	-	-	-	-
3-Carvomentona	1254	-	-	-	-	-	-	-	0,54	-	-
Piperitona	1254	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23
4-Metoxi-benzaldeído	1255	-	-	-	1,88	-	-	-	-	-	-
Geranial	1274	-	-	38,68	-	3,59	-	-	-	-	-
Acetato de neoisomentila	1275	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,18
Acetato de bornila	1284	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Anetol	1287	-	-	-	80,92	-	-	-	-	-	-
2-Undecanona	1296	-	-	0,90	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos) (continuação)**

Composto <sup>a</sup>	IRE <sup>b</sup>	Alecrim	Canela	Capim-limão	Funcho	Laranja	Louro	Manjeriçã	Menta	Orégano	Poejo
Acetato de mentila	1296	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,21
Timol	1303	-	-	-	-	-	-	-	-	2,81	-
Formato de geranila	1304	-	-	0,17	-	-	-	-	-	-	-
Metil geranato	1327	-	-	-	-	0,16	-	-	-	-	-
Acetato de $\alpha$ -terpinila	1349	-	-	-	-	-	9,65	-	-	-	0,40
Acetato de citronelila	1357	-	-	-	-	0,47	-	-	-	-	-
Eugenol	1360	-	-	-	-	-	-	11,31	-	-	-
Acetato de nerila	1367	-	-	-	-	0,56	0,20	-	-	-	-
$\alpha$ -Copaeno	1371	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19
1-(4-metoxifenil)-propan-2-ona	1385	-	-	-	0,39	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Bourboneno	1380	-	-	-	-	-	-	-	-	0,38	1,42
$\beta$ -Elemeno	1389	-	-	-	-	-	1,10	-	-	-	0,49
$\beta$ -Cariofileno	1413	5,40	1,80	-	-	0,22	2,69	1,47	-	2,14	25,67
$\alpha$ -Guaieno	1435	-	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-
( <i>E</i> )- $\alpha$ -Bergamoteno	1442	-	-	-	-	-	-	1,50	-	-	-
acetato de cinamila	1447	-	1,27	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Humuleno	1447	0,94	-	-	-	-	0,74	0,37	-	0,36	4,60
Germacreno D	1476	-	0,74	-	-	-	0,56	3,87	0,45	2,92	12,55

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos) (continuação)**

Composto <sup>a</sup>	IRE <sup>b</sup>	Alecrim	Canela	Capim-limão	Funcho	Laranja	Louro	Manjerição	Menta	Orégano	Poejo
Germacreno B	1492	-	1,95	-	-	-	-	0,52	-	-	6,86
$\alpha$ -Farneseno	1499	-	-	-	-	-	2,54	-	-	-	-
$\alpha$ -Bulneseno	1500	-	-	-	-	-	-	1,34	-	-	-
$\beta$ -Bisaboleno	1507	0,35	-	-	-	-	-	-	-	0,86	-
Elemol	1548	-	0,36	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-Nerolidol	1564	-	0,35	-	-	-	-	-	-	-	0,65
Espatuleno	1573	-	2,27	-	-	-	-	-	-	1,34	-
Óxido de Cariofileno	1577	0,23	1,42	-	-	-	-	-	-	0,45	0,96
5-Azulenoetanol	1595	-	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-
Viridiflorol	1598	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15
t-Cadinol	1639	-	-	-	-	-	-	1,96	-	-	-
$\beta$ -Eudesmol	1646	-	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Eudesmol	1649	-	0,18	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Cadinol	1653	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13
Bulnesol	1664	-	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Sinensal	1698	-	-	-	-	0,95	-	-	-	-	-
Monoterpenos hidrocarbonados		43,09	51,41	8,79	11,55	71,52	20,11	8,07	2,81	81,25	3,60

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais avaliados, determinada por CG – DIC e CG - EM (resultados expressos como % relativo das áreas dos picos) (continuação)**

<b>Composto<sup>a</sup></b>	<b>IRE<sup>b</sup></b>	<b>Alecrim</b>	<b>Canela</b>	<b>Capim-limão</b>	<b>Funcho</b>	<b>Laranja</b>	<b>Louro</b>	<b>Manjeriço</b>	<b>Menta</b>	<b>Orégano</b>	<b>Poejo</b>
Monoterpenos oxigenados		46,30	28,48	71,72	1,57	21,72	63,93	66,32	93,80	7,19	31,04
Sesquiterpenos hidrocarbonados		6,90	4,85	-	-	0,22	7,88	9,07	0,45	6,66	51,78
Sesquiterpenos oxigenados		0,23	6,01	-	-	0,95	-	1,96	-	1,79	1,89
Outros		0,18	1,27	0,90	86,29	-	-	11,31	-	-	0,16
Total identificado (%)		96,70	92,02	81,41	99,41	94,41	91,92	96,73	97,06	96,89	88,47
Rendimento em óleo essencial (% m/m de material fresco)		0,26	0,24	0,17	0,27	0,06	0,19	0,27	0,36	0,04	0,07

<sup>a</sup> Os compostos estão listados em ordem de eluição da coluna Rtx-5MS

<sup>b</sup> Índice de retenção determinado experimentalmente na coluna Rtx-5MS, utilizando-se uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>

Os constituintes majoritários no óleo de orégano foram o  $\gamma$ -terpineno (31,68%), (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (16,03%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (11,68%) e *o*-cimeno (11,43%). Em quantidades inferiores, os monoterpenos oxigenados e os sesquiterpenos hidrocarbonados ocorreram em níveis similares, somando 7,19 e 6,66%, respectivamente.

Estes resultados divergem em parte da maioria dos estudos envolvendo a composição química do óleo essencial de orégano, em que os monoterpenos oxigenados carvacrol e timol são geralmente os compostos majoritários (CHORIANOPOULOS et al., 2004). De modo semelhante ao nosso estudo, o  $\gamma$ -terpineno foi detectado como o composto majoritário (30,6%) no óleo essencial do clone “Green Spanish” de orégano (FARIAS et al., 2010).

Dentre os componentes voláteis dos óleos essenciais de manjeriço (*O. basilicum*), louro (*L. nobilis*), capim-limão (*C. flexuosus*) e menta (*M. arvensis*), os monoterpenos oxigenados constituíram a fração predominante e totalizaram, respectivamente, 66,32%, 63,93%, 71,72% e 93,80% das composições. Os compostos mais abundantes no óleo de manjeriço foram linalol (35,57%), 1,8-cineol (16,42%), eugenol (11,3%) e cânfora (9,98%). Observa-se uma grande variabilidade na composição química de óleos essenciais de *O. basilicum* (RUNYORO et al., 2010; CAROVIC-STANKO et al., 2010), que ocorre em diferentes quimiotipos, incluindo linalol, metilchavicol, eugenol, metileugenol e geraniol, entre outros (GRAYER et al., 1996). Labra et al. (2004), avaliando a composição de nove variedades de manjeriço, reportaram uma composição similar à observada no presente estudo, em que o linalol (18,96-37,59%), eugenol (3,34-31,51%) e cineol (7,09-14,22%) foram os compostos encontrados em maior quantidade. No óleo essencial de louro também se destacaram os monoterpenos oxigenados 1,8-cineol (35,50%) e linalol (14,10%), seguidos em menores proporções pelo sabineno (9,45%) e o éster acetato de terpinila (9,65%). Estes resultados estão de acordo com dados previamente reportados para esta espécie vegetal (OUSSALAH et al., 2006). No óleo essencial de capim-limão, mais da metade de sua composição deveu-se às contribuições dos compostos geranial (38,68%) e neral (28,46%). Para esta amostra, apenas 81,41% dos constituintes foram devidamente caracterizados devido à dificuldade para identificação de compostos minoritários. Geranial (cital a) e neral (cital b) também foram descritos como os compostos majoritários presentes no óleo essencial de capim-limão (*C. flexuosus*), em estudo realizado por Oussalah et al. (2006). Por fim, neste grupo, o óleo

essencial de menta foi caracterizado pela alta concentração de mentol, o qual totalizou 86,05% dos constituintes voláteis, concordando com estudo prévio realizado com a espécie *M. arvensis* (DUARTE et al., 2005).

Dentre as amostras analisadas, os óleos de funcho (*F. vulgare*), poejo (*M. pulegium*) e alecrim (*R. officinalis*) apresentaram padrões diferentes daqueles apresentados pelos demais óleos essenciais avaliados. Para o funcho, o derivado aromático *trans*-anetol tomou parte em 80,92% da composição, o que concorda com outros estudos acerca da composição química deste óleo essencial obtido por hidrodestilação, especialmente para o quimiotipo doce (DÍAZ-MAROTO et al., 2006). Os sesquiterpenos (51,78%) foram os compostos em maior concentração no óleo de poejo, destacando-se o  $\beta$ -cariofileno (25,67%) e o germacreno D (12,55%). A pulegona, geralmente presente em concentrações variáveis no óleo essencial de poejo (BOUCHRA et al., 2003; MAHBOUBI; HAGHI, 2008), não fez parte da composição deste óleo no presente estudo, embora outros compostos característicos, como a mentona, estiveram presentes.

O óleo de alecrim apresentou níveis equivalentes de monoterpenos hidrocarbonados e oxigenados, que representaram respectivamente 43,09% e 46,30%. Nesta amostra, ocorreram como componentes voláteis majoritários a cânfora (24,02%), o 1,8-cineol (14,24), o  $\beta$ -mirceno (12,50%), o  $\alpha$ -pineno (9,85%) e o  $\beta$ -pineno (6,99%). Quando comparados à literatura, estes resultados apresentam diferenças e similaridades. De forma semelhante ao presente estudo, Bozin et al., (2007) reportam níveis equivalentes de monoterpenos hidrocarbonados e monoterpenos oxigenados (44,7% and 46,9%, respectivamente), sendo o  $\alpha$ -pineno (13,5%), o limoneno (21,7%), a cânfora (21,6%) e o óxido de Z-linalol (10,8%) os principais constituintes. Oussalah et al. (2006) reportam a composição química de óleos essenciais provenientes de três variedades de alecrim. A composição do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis camphreiferum* foi bastante similar à determinada no presente trabalho, com o 1,8-cineol (23,59%), a cânfora (18,2%) e o  $\alpha$ -pineno (12,55%) como componentes majoritários. Viuda-Martos et al. (2010) também reportam uma composição química similar para um óleo essencial de alecrim orgânico.

### 3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS AVALIADOS

A Tabela 3 apresenta a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, avaliada através do teste de difusão em disco. Todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana, contra diferentes espécies de bactérias e em diferentes intensidades. Os óleos que apresentaram maior atividade e espectro de ação foram, em ordem decrescente, os de capim-limão, manjeriço, orégano, canela, louro e alecrim.

Os óleos essenciais que se mostraram mais ativos no ensaio de difusão em disco, ou que se destacaram por apresentar atividade contra bactérias Gram-negativas, foram avaliados quanto à CMI e CMB, frente a seis espécies de bactérias, 3 Gram-positivas e 3 Gram-negativas. Conforme pode ser observado na Tabela 4, os valores de CMI situaram-se entre 0,075 e 10 mg/mL e os de CMB entre 0,31 e >10 mg/mL.

No ensaio de difusão em disco (Tabela 3), o óleo essencial de capim-limão apresentou forte inibição contra todas as bactérias Gram-positivas testadas, ou seja, *S. aureus*, *L. plantarum*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *B. cereus* e *B. subtilis*. Dentre as bactérias Gram-negativas, exibiu forte inibição contra *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris*, inibição moderada contra *E. coli* e fraca inibição contra *E. aerogenes* e *P. aeruginosa*. Apresentou inibição significativamente superior ( $p < 0,05$ ) do que os antibióticos de referência testados contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*. As zonas de inibição foram semelhantes às observadas por Wannisorn et al. (2005) para um óleo essencial da espécie de capim-limão *Cymbopogon citratus*.

A forte atividade antibacteriana apresentada pelo óleo essencial de capim-limão foi confirmada pelos baixos valores de CMI e CMB ( $\leq 1,25$  mg/mL) observados contra todos os micro-organismos testados (Tabela 4). Este óleo essencial foi o mais eficiente dentre os que foram avaliados, com destaque para *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, importantes patógenos e indicadores de qualidade em alimentos. Conforme os dados do presente trabalho e também reportado por Schaneberg e Khan (2002), o óleo essencial de capim-limão é constituído principalmente por citral, uma mistura dos isômeros geranial e neral, que apresenta considerável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ONAWUNMI, 1989).

**Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, detectada no ensaio de difusão em disco (mm) <sup>a</sup>**

	Alecrim ( <i>R. officinalis</i> )	Canela <sup>b</sup> ( <i>C. zeylanicum</i> )	Capim-limão ( <i>C. flexuosus</i> )	Funcho ( <i>F. vulgare</i> )	Laranja <sup>b</sup> ( <i>C. sinensis</i> )	Louro ( <i>L. nobilis</i> )
<i>S. aureus</i>	28,2 ± 0,9 c	17,4 ± 0,2 hi	50,5 ± 1,7 a	12,1 ± 0,5 j	21,5 ± 1,1 f	18,9 ± 0,5 gh
<i>E. faecalis</i>	14,9 ± 0,7 ef	14,6 ± 0,6 ef	24,7 ± 0,9 b	11,8 ± 0,3 g	17,1 ± 0,5 d	13,6 ± 0,7 f
<i>L. monocytogenes</i>	26,5 ± 1,4 cd	15,2 ± 0,3 fg	52,1 ± 1,2 a	12,5 ± 0,4 g	21,2 ± 2,7 e	21,4 ± 0,8 e
<i>L. plantarum</i>	12,1 ± 0,5 i	22,0 ± 1,8 de	23,2 ± 0,9 cd	13,8 ± 0,6 hi	14,1 ± 0,6 hi	nd
<i>B. cereus</i>	26,4 ± 0,5 c	21,2 ± 0,9 d	42,7 ± 1,5 a	16,0 ± 0,4 ef	33,1 ± 1,2 b	20,2 ± 0,6 d
<i>B. subtilis</i>	36,0 ± 0,6 c	19,0 ± 0,4 ef	42,2 ± 4,0 b	13,1 ± 0,5 h	85,0 ± 0,0 a	31,4 ± 0,6 d
<i>Y. enterocolitica</i>	16,7 ± 0,5 f	14,0 ± 0,0 g	30,1 ± 1,2 b	11,8 ± 0,3 g	26,7 ± 1,5 cd	14,0 ± 0,9 g
<i>E. coli</i>	12,2 ± 0,3 g	11,5 ± 0,0 g	17,2 ± 0,3 e	11,1 ± 0,2 g	nd	24,5 ± 0,7 b
<i>S. Typhimurium</i>	10,5 ± 0,0 e	10,4 ± 0,2 e	18,2 ± 0,5 c	nd	nd	10,9 ± 0,5 e
<i>E. aerogenes</i>	10,2 ± 0,3 c	10,5 ± 0,4 c	13,9 ± 1,9 b	nd	nd	11,0 ± 0,4 c
<i>P. vulgaris</i>	14,9 ± 2,3 g	16,5 ± 0,7 fg	40,9 ± 1,6 a	19,0 ± 0,4 ef	27,7 ± 3,0 c	31,7 ± 2,2 b
<i>P. aeruginosa</i>	nd	nd	13,6 ± 0,2 a	nd	nd	nd

**Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, detectada no ensaio de difusão em disco (mm) <sup>a</sup> (continuação)**

	Manjeriçao ( <i>O. basilicum</i> )	Menta ( <i>M. arvensis</i> )	Orégano ( <i>O. vulgare</i> )	Poejo ( <i>M. pulegium</i> )	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>S. aureus</i>	20,5 ± 0,4 fg	25,1 ± 1,4 de	22,9 ± 1,0 ef	16,0 ± 0,4 i	36,4 ± 1,8 b	26,1 ± 0,5 cd
<i>E. faecalis</i>	19,2 ± 0,6 c	14,1 ± 0,5 f	16,0 ± 0,7 de	13,7 ± 0,6 f	27,0 ± 0,4 a	23,6 ± 0,2 b
<i>L. monocytogenes</i>	19,0 ± 0,7 e	15,4 ± 1,3 f	25,4 ± 1,3 d	13,9 ± 0,6 fg	31,1 ± 0,9 b	28,4 ± 1,0 bc
<i>L. plantarum</i>	26,1 ± 1,2 bc	19,6 ± 0,9 ef	17,4 ± 1,1 fg	24,0 ± 2,3 cd	32,0 ± 0,9 a	29,2 ± 1,0 ab
<i>B. cereus</i>	20,1 ± 1,1 d	21,4 ± 1,7 d	26,2 ± 0,6 c	17,1 ± 0,2 e	12,1 ± 0,2 g	27,9 ± 0,7 c
<i>B. subtilis</i>	21,1 ± 0,8 e	21,1 ± 0,8 e	18,0 ± 1,7 efg	17,7 ± 0,9 fg	31,1 ± 1,8 d	29,9 ± 0,5 d
<i>Y. enterocolitica</i>	45,3 ± 2,0 a	24,7 ± 1,8 d	18,9 ± 1,2 f	nd	21,7 ± 0,5 e	28,1 ± 0,5 bc
<i>E. coli</i>	21,6 ± 1,1 c	nd	14,5 ± 0,4 f	nd	18,9 ± 0,5 d	26,1 ± 0,6 a
<i>S. Typhimurium</i>	12,9 ± 0,2 d	nd	12,0 ± 0,8 d	nd	27,1 ± 0,5 a	24,4 ± 0,5 b
<i>E. aerogenes</i>	13,9 ± 0,5 b	nd	11,4 ± 0,5 c	nd	nd	23,0 ± 0,7 a
<i>P. vulgaris</i>	34,6 ± 0,5 b	41,5 ± 2,1 a	23,7 ± 0,6 d	nd	21,1 ± 1,0 de	22,4 ± 0,8 de
<i>P. aeruginosa</i>	nd	nd	12,7 ± 0,5 b	nd	nd	nd

<sup>a</sup> Zona de inibição incluindo o diâmetro do disco, de 9mm. Os dados referem-se à média de quatro replicatas, ± desvio padrão. Graus de inibição: 10 -13,9 mm: fraca; 14-18 mm: moderada; >18 mm: forte. Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes (p<0,05). nd: não detectada. <sup>b</sup> Os óleos essenciais de canela e de laranja foram obtidos a partir das folhas da planta.

**Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais testados (mg/mL) <sup>a</sup>**

	Alecrim ( <i>R. officinalis</i> )		Canela <sup>b</sup> ( <i>C. zeylanicum</i> )		Capim-limão ( <i>C. flexuosus</i> )		Louro ( <i>L. nobilis</i> )		Manjeriço ( <i>O. basilicum</i> )		Orégano ( <i>O. vulgare</i> )	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S. aureus</i>	10,0	>10,0	5,0	10,0	0,31	0,31	10,0	>10,0	2,5	2,5	5,0	5,0
<i>L. monocytogenes</i>	2,5	>10,0	2,5	5,0	0,62	0,62	2,5	10,0	1,25	2,5	2,5	10,0
<i>B. cereus</i>	5,0	10,0	2,5	5,0	0,15	0,31	5,0	5,0	1,25	1,25	2,5	2,5
<i>Y. enterocolitica</i>	0,075	1,25	0,075	1,25	0,075	0,31	0,62	0,62	0,075	0,15	0,075	2,5
<i>E. coli</i>	2,5	5,0	5,0	10,0	0,62	0,62	2,5	2,5	1,25	1,25	5,0	10,0
<i>S. Typhimurium</i>	10,0	>10,0	5,0	10,0	1,25	1,25	5,0	10,0	2,5	2,5	5,0	10,0

<sup>a</sup> Os testes foram realizados em triplicata e os valores modais são apresentados. <sup>b</sup> O óleo essencial de canela foi obtido a partir das folhas da planta

O óleo essencial de manjeriço também apresentou forte ação inibitória contra todas as bactérias Gram-positivas testadas (Tabela 3). Além disso, demonstrou ser fortemente inibitório para *Y. enterocolitica*, (maior zona de inibição observada para este micro-organismo), *P. vulgaris* e *E. coli*. Este óleo foi mais ativo ( $p < 0,05$ ) que a ampicilina e o cloranfenicol contra *P. vulgaris* e *Y. enterocolitica*, este último um importante patógeno alimentar. No teste de microdiluição, apresentou atividade inibitória forte a moderada (CMI e CMB  $\leq 2,5$  mg/mL) contra os micro-organismos testados, sendo o segundo óleo mais ativo dentre os óleos essenciais avaliados. O óleo essencial de manjeriço foi caracterizado pela presença de linalol, 1,8-cineol e eugenol. De fato, o linalol e o 1,8-cineol apresentam atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Sokovic et al. (2007). Além disso, o eugenol também é reconhecido como uma importante substância com atividade antimicrobiana (WALSH et al., 2003; GALLUCI et al., 2009), e também contribui para a atividade apresentada por este óleo essencial.

Duarte et al. (2007) reportaram forte atividade antimicrobiana (CMI entre 200 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de manjeriço contra 3 sorotipos de *E. coli* patogênica. Entretanto, Runyoro et al. (2010), reportaram fraca a moderada atividade deste óleo (CMI de 10,7 e 12,5 mg/mL contra *S. aureus* e de 3,14 e 4,25 mg/mL contra *E. coli*) para duas amostras de manjeriço avaliadas, pobres em linalol e eugenol. Isto reforça a importância de avaliar-se a composição química e a atividade biológica de plantas cultivadas em diferentes regiões.

O óleo essencial de louro destacou-se pela potente inibição contra *E. coli* (maior zona de inibição frente a este micro-organismo), apresentando também atividade contra as demais bactérias Gram-negativas testadas, com exceção de *P. aeruginosa* (Tabela 3). Nos ensaios de CMI e CMB, apresentou atividade forte a moderada (CMI  $\leq 5$  mg/mL) contra todos os micro-organismos testados, com exceção de *S. aureus* (Tabela 4). Foi o terceiro melhor óleo avaliado quanto à inibição das bactérias Gram-negativas testadas. Apesar de estarem presentes em diferentes proporções em comparação ao óleo de manjeriço, 1,8-cineol e linalol também foram os componentes majoritários identificados no óleo essencial de louro. Dadalioglu e Evrendilek (2004) reportaram forte atividade antibacteriana deste óleo essencial contra *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *S. aureus*. De forma semelhante ao presente estudo, os autores identificaram 1,8-cineol (cerca de 60%) como o principal constituinte.

Os óleos essenciais de orégano e da folha da canela apresentaram atividade moderada contra a maioria das bactérias testadas no teste de difusão em disco, conforme pode ser observado na Tabela 3. Os valores de CMI obtidos para o óleo essencial de orégano contra *E. coli* e *S. Typhimurium* (Tabela 4) foram inferiores aos obtidos por Peñalver et al. (2005), que avaliaram a atividade antimicrobiana de 5 óleos essenciais sobre espécies de *Salmonella* e *E. coli* isoladas de suínos e aves. Oussalah et al. (2007), avaliando o óleo essencial obtido das folhas de uma espécie de canela (*Cinnamomum verum*) através do método de diluição em ágar, obtiveram valores de CMI inferiores aos do presente trabalho para *E. coli* O157:H7 e *S. Typhimurium* (0,1% ou 1,0 mg/mL) e *S. aureus* (0,05% ou 0,5 mg/mL), porém muito semelhante para *L. monocytogenes* (0,2% ou 2,0 mg/mL).

O óleo essencial de alecrim apresentou valores maiores de CMI e CMB para *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* do que os demais óleos essenciais avaliados, apesar de ter apresentado forte inibição contra esses micro-organismos no teste preliminar de difusão em disco. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Celiktas et al. (2007), com CMI e CMB de óleos essenciais de alecrim para *S. aureus* variando de 5 a 20 mg/mL e 10 a >20mg/mL, respectivamente.

Os óleos essenciais de funcho, poejo, folha de laranja e menta, em geral mostraram-se menos ativos que os demais óleos avaliados, entretanto algumas especificidades podem ser destacadas, como a forte inibição apresentada pelo óleo essencial de menta contra *P. vulgaris*, a forte atividade inibitória do poejo contra *L. plantarum* e a excepcional atividade da laranja contra *B. subtilis* (Tabela 3).

No presente estudo, detectamos atividade inibitória, embora fraca, de *P. aeruginosa* pelos óleos essenciais de capim-limão e de orégano. *P. aeruginosa* é um micro-organismo conhecido por apresentar resistência a muitos agentes antimicrobianos e desinfetantes (RUSSEL, 1991; PAPADOPOULOS et al., 2006). Sua resistência também tem sido reportada para vários antimicrobianos naturais derivados de plantas (WAN et al., 1998; BURT, 2004; MATASYOH et al., 2009), embora alguns estudos detectem susceptibilidade a certos óleos essenciais (CELIK TAS et al., 2007; RUNYORO et al., 2010). Hammer, Carson e Riley (1999) reportaram sensibilidade de *P. aeruginosa* aos óleos essenciais de capim-limão, orégano e *Pimenta racemosa*, de um conjunto de 52 óleos essenciais comerciais avaliados. Por outro lado, *Y. enterocolitica* mostrou alta susceptibilidade a seis dos óleos essenciais avaliados no presente estudo. Manjerição, capim-limão, folha de laranja e menta apresentaram as maiores zonas de inibição (Tabela 3). Outros

trabalhos reportam sensibilidade de *Y. enterocolitica* aos óleos essenciais de orégano (DORMAN; DEANS, 2000; BAYDAR et al., 2004), manjeriço (WAN; WILCOCK; COVENTRY, 1998) e alecrim (LÓPEZ et al., 2005), avaliada através de métodos de difusão em ágar. Apesar da elevada susceptibilidade apresentada por *Y. enterocolitica*, em geral, as bactérias Gram-positivas mostraram-se mais suscetíveis à ação antimicrobiana dos óleos essenciais avaliados do que as bactérias Gram-negativas testadas. Vários autores reportam uma maior atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias Gram-positivas (BURT, 2004; CHORIANOPOULOS et al., 2004; CAO et al., 2009). Neste grupo de bactérias, a resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos é baixa, pois não há receptores específicos de membrana ou permeases que controlem a entrada de substâncias na célula. Já nas bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo da membrana externa limita o acesso destes agentes, especialmente de substâncias lipofílicas, aos fosfolipídios da membrana celular (RUSSEL, 1991).

Diversos mecanismos têm sido propostos a fim de explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, que são geralmente compostos por monoterpenos, sesquiterpenos, e seus derivados oxigenados (RAHMAN; KANG, 2009). Estes compostos lipofílicos podem causar danos à membrana celular, o que posteriormente afeta a homeostase e o equilíbrio de pH e de íons inorgânicos (COWAN, 1999; BURT, 2004; SHYLAJA; PETER, 2004). Além disso, podem levar à perda de componentes celulares tais como lipídios e proteínas (OYEDEMI et al., 2009). Os resultados do presente estudo indicam que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais avaliados pode ser atribuída, em grau considerável, à presença dos monoterpenos oxigenados linalol, 1,8-cineol, neral e geranial, que foram os compostos majoritários presentes em quatro (manjeriço, capim-limão, louro e canela) dos seis óleos essenciais que apresentaram maior potencial antimicrobiano frente às bactérias testadas. Além disso, observou-se correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre o nível de monoterpenos oxigenados presentes nos óleos essenciais e os valores de CMI e CMB contra *E. coli*, com coeficientes de correlação de Spearman de -0,97101 e -0,98561, respectivamente. É importante salientar, porém, que compostos minoritários também podem contribuir de forma significativa para a atividade antimicrobiana de óleos essenciais, uma vez que os ensaios muitas vezes demonstram que compostos isolados apresentam menor atividade em comparação ao óleo essencial (BURT, 2004).

Um aspecto interessante no que concerne à atividade antimicrobiana de óleos essenciais é que o risco de que microorganismos patogênicos venham a desenvolver resistência é muito baixo, uma vez que estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam através de diversos mecanismos (BAKKALI et al., 2008; OKE et al., 2009; RAHMAN; KANG, 2009). Esta é uma característica benéfica e vantajosa dos produtos derivados de plantas sobre outros agentes antimicrobianos, e pode vir a aumentar a segurança alimentar e a vida de prateleira dos alimentos.

Em conclusão, os óleos essenciais de capim-limão, manjeriço, orégano e louro apresentaram o melhor potencial para utilização como agentes antimicrobianos naturais em alimentos. A seleção do óleo essencial a ser utilizado deve ser feita levando-se em consideração os patógenos e/ou a microbiota deteriorante associada ao alimento de interesse. Também é importante que o óleo essencial selecionado seja sensorialmente compatível com o alimento. Após a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*, esta deve ser avaliada na matriz alimentícia de interesse, uma vez que a composição e a estrutura do alimento podem influenciar essa atividade.

#### 4 REFERÊNCIAS

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169-172, 2004.

BOUCHRA, C. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p.165–169, 2003.

BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7879-7885, 2007.

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

CAO, L. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, p. 801-805, 2009.

CAROVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Tenth Edition**. CLSI document M2-A10 [ISBN 1-56238-688-3]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009b.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DADALIOGLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8255-8260, 2004.

DÍAZ-MAROTO, M. C. et al. ;Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from ventral Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6814-6818, 2006.

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

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

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

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

ESPINA, L. et al.; Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, p. 896-902, 2011.

FARÍAS, G.; BRUTTI, O.; GRAU, R.; DI LEO LIRA, P.; RETTA, D.; van BAREN, C. Morphological, yielding and quality descriptors of four clones of *Origanum* spp. (*Lamiaceae*) from the Argentine littoral region germplasm bank. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 472-480, 2010.

GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, p. 348-354, 2009.

GRAYER, R.J.; KITE, G.C.; GOLDSTONE, F.J.; BRYAN, S.E.; PATON, A.; PUTIEVSKY, E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999.

LABRA, M.; MIELE, M.; LEDDA, B.; GRASSI, F.; MEZZEI, M.; SALA, F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v. 167, p. 725-731, 2004.

LÓPEZ, P. et al. Solid-and Vapor-Phase Antimicrobial Activities of Six Essential Oils: Susceptibility of Selected Foodborne Bacterial and Fungal Strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939-6946, 2005.

MAHBOUBI, M.; HAGHI, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 325-327, 2008.

MATASYOH, J. C. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 526-529, 2009.

OKE, F. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. **Food Chemistry**, v. 112, p. 874-879, 2009.

ONAWUNMI, G. O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 105-108, 1989.

OUSSALAH, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, p. 236-244, 2006.

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

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1280-1286, 2009.

PAPADOPOULOS , C. J. et al. Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 449-451, 2006.

PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica - APMIS**, v. 113, p. 1-6, 2005.

RAHMAN, A.; KANG, S. C. Inhibition of foodborn pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) B.S.P. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176-189, 2009.

RUNYORO, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 119, p. 311-316, 2010.

RUSSEL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 191-201, 1991.

SAS INSTITUTE INC. **System for Microsoft Windows**, Release 9.1, Cary, NC, USA, 2002-2003. (cd-rom).

SCHANEBERG, B. T.; KHAN, I. A. Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1345-1349, 2002.

SHYLAJA. M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: **Handbook of herbs and spices**. v.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 360 p.

SMÂNIA JR., A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

SOKOVIC, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. **Food**, v.1, n. 2, p. 220-226, 2008.

VIUDA-MARTOS, M.; EL-GENDY, A.E.G.S.; SENDRA, E.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; EL-RAZIK, K.A.A.; OMER, E.A.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9063-9070, 2010.

WALSH, S. E. et al. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and –negative bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 240-247, 2003.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M. J. The effect os essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 152-158, 1998.

WANG, R.; WANG, R.; YANG, B. Extraction of five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 289-292, 2009.

WANNISSORN, B. et al. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 76, p. 233-236, 2005.

## **CAPÍTULO 3**

### **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*), EUCALIPTO (*Eucalyptus paniculata*) E LAVANDA (*Lavandula angustifolia*)**



**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA  
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITRONELA (*Cymbopogon  
winterianus*), EUCALIPTO (*Eucalyptus paniculata*) E LAVANDA  
(*Lavandula angustifolia*)**

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi determinar a composição química de óleos essenciais obtidos a partir de três espécies de plantas medicinais cultivadas na região Sul do Brasil: *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda) e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a 11 espécies de bactérias, dentre elas espécies de importância em alimentos e em saúde pública. A composição dos óleos essenciais, obtidos por destilação a vapor, foi determinada por CG/DIC e CG/EM. A atividade antimicrobiana foi detectada através do método de difusão em disco e a CMI e CMB foram determinadas pelo método de microdiluição. Os óleos essenciais de lavanda e citronela apresentaram monoterpenos oxigenados como componentes majoritários, enquanto para o óleo de eucalipto os monoterpenos hidrocarbonados foram os principais constituintes. O óleo essencial de citronela foi o mais ativo contra a maioria das bactérias testadas, com valores de CMI e CMB para *Yersinia enterocolitica* de 0,075 e 0,31 mg/mL, respectivamente. O óleo essencial de lavanda destacou-se por apresentar atividade inibitória contra *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, enquanto o óleo de eucalipto foi ativo contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos demonstram que os óleos essenciais avaliados apresentam potencial para aplicação como agentes antimicrobianos naturais.

**Palavras-chave:** óleos essenciais, atividade antimicrobiana, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus paniculata*, *Lavandula angustifolia*.

**ABSTRACT**

The aim of the present study was to determine the chemical composition of essential oils derived from three medicinal plant species growing in the South of Brazil: *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Eucalyptus*

*paniculata* (eucalyptus), and *Lavandula angustifolia* (lavender), and to evaluate their antimicrobial activity against 11 bacterial species, including those related to foodborne and human pathogens. The chemical composition of the essential oils obtained by steam distillation was determined by GC and GC/MS. Antimicrobial activity was screened by disc-diffusion assay. CMI and CMB of the sensitive strains were determined by the microdilution method. The main components of lavender and citronella essential oils were oxygenated monoterpenes and monoterpene hydrocarbons in eucalyptus oil. Citronella presented the lowest CMI and CMB values against most of the tested bacteria, with CMI and CMB values against *Yersinia enterocolitica* of 0.075 and 0.31 mg/mL, respectively. Lavender oil was active against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium, and eucalyptus inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. The results showed that the evaluated essential oils can be potentially used as natural antimicrobial agents.

**Keywords:** essential oils, antimicrobial activity, *Cymbopogon winterianus*, *Eucalyptus paniculata*, *Lavandula angustifolia*.

## 1 INTRODUÇÃO

A vida vegetal tem sido, ao longo das eras de evolução, alimento e remédio para toda a sorte de espécies animais, das mais primitivas às mais especializadas. A busca e o uso de plantas com substâncias bioativas é uma prática multimilenar, atestada em vários tratados de fitoterapia das grandes civilizações há muito desaparecidas (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; SILVA JÚNIOR, 2003). Atualmente, com a emergência de linhagens de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, observa-se uma renovação no interesse pela busca de agentes antimicrobianos alternativos. Além disso, o consumidor tem valorizado cada vez mais a disponibilização de produtos cosméticos e alimentícios mais naturais e saudáveis, e que possam trazer algum benefício à saúde (LIVERMORE, 2002; CHORIANOPOULOS et al., 2004; BONOMO; SZABO, 2006; RAHMAN; KANG, 2009). Esses fatores têm contribuído para aumentar o interesse na pesquisa de produtos naturais que apresentem atividades biológicas tais como a atividade antimicrobiana.

Óleos essenciais são produtos aromáticos e voláteis derivados do metabolismo secundário de plantas, formados em células e grupos de

células especiais, e normalmente encontram-se concentrados em uma determinada região tal como folhas, frutos ou casca (OLIVEIRA; AKISSUE; AKISSUE, 2005).

Encontram-se, na literatura, várias publicações a respeito da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (CHORIANOPOULOS et al., 2004; RUNYORO et al., 2010; TYAGI; MALIK, 2011). Entretanto, freqüentemente, encontram-se diferenças significativas na atividade antimicrobiana reportada para uma mesma espécie vegetal. Estas diferenças devem-se, principalmente, às diferentes localizações geográficas, época de coleta, genótipo e condições climáticas (OUSSALAH et al., 2007), sendo portanto necessária a caracterização da composição química e da atividade biológica de óleos essenciais obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

Os óleos essenciais possuem amplo potencial de aplicação, em áreas como a medicina e a farmacologia, a cosmética, a culinária e a agricultura (MATTOS et al., 2007), podendo ser utilizados como aromatizantes de alimentos e doces, na fabricação de produtos de higiene e limpeza, entre outros.

Diversas espécies do gênero *Eucalyptus* vêm sendo cultivadas em larga escala em várias partes do mundo. No Brasil, este gênero é encontrado em todas as regiões, sendo conhecidas cerca de 400 espécies, das quais são utilizados desde o caule para a extração da celulose, até as folhas, que armazenam óleos essenciais de diferentes composições químicas (ESTANISLAU et al., 2001). Extratos obtidos a partir das folhas de eucalipto são aprovados para o uso como aditivos alimentares, sendo também de uso corrente em formulações cosméticas (GILLES et al., 2010). Espécies de eucalipto também são utilizadas na medicina popular como antisséptico e em alguns problemas respiratórios, estimulando a atividade secretora do epitélio respiratório (SIMÕES; SPITZER, 2007). Encontra-se, na literatura, várias publicações acerca da atividade antimicrobiana de espécies de eucalipto (ESTANISLAU et al., 2001; SARTORELLI et al., 2007; GILLES et al., 2010), entretanto, não encontramos dados acerca desta atividade para a espécie *E. paniculata*, tema do presente estudo.

As plantas do gênero *Lavandula*, pertencentes à família *Lamiaceae*, têm sido utilizadas para uma variedade de propósitos cosméticos e terapêuticos. As principais espécies de uso medicinal são *L. angustifolia* (*L. officinalis*), *L. stoechas*, *L. latifolia* e *L. x intermedia*. O óleo essencial de lavanda é bastante utilizado na aromaterapia, com efeitos neurológicos benéficos no alívio dos sintomas de estresse e depressão. Também são relatados efeitos antiespasmódico, analgésico,

pesticida e antimicrobiano (CAVANAGH; WILKINSON, 2002), com atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes (MRSA) e atividade antifúngica (DAFERERA et al., 2000; ROLLER et al., 2009). Os constituintes do óleo essencial de uma mesma espécie de lavanda podem variar consideravelmente dependendo do cultivar e do método de extração, e esta variação poderá determinar o valor de mercado e as possíveis aplicações do produto (CAVANAGH; WILKINSON, 2002). Diferenças na composição química tornam alguns óleos mais efetivos contra determinadas espécies de bactérias, direcionando seu uso terapêutico (CAVANAGH; WILKINSON, 2005).

O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 140 espécies e é amplamente distribuído nas regiões de clima semi-temperado a tropical em todo o mundo. Duas espécies principais de citronela são conhecidas e têm importância industrial na área farmacêutica, cosmética e de perfumaria: *C. nardus* (citronela do Ceilão) e *C. winterianus* (citronela de Java) (SHASANY et al., 2000). Dentre suas atividades biológicas, destacam-se a ação repelente de insetos, apresentando atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* (MENDONÇA et al., 2005; NERIO et al., 2010) e a atividade antimicrobiana (DUARTE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi determinar a composição química de óleos essenciais obtidos de três espécies de plantas medicinais cultivadas na região Sul do Brasil: *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda) e avaliar sua atividade antimicrobiana frente a 11 espécies de bactérias, dentre elas espécies de importância em alimentos e em saúde pública.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O material vegetal foi coletado na cidade de Concórdia – SC (27° 14' 02" S 52° 01' 40" O), Brasil, no período de novembro de 2009 a março de 2010. A identificação botânica das espécies foi realizada pelo Dr. A. Jasper (Univates, RS, Brasil), e as exsiccatas (Tabela 1) foram depositadas no Herbário do Museu de Ciências Naturais do Departamento de Botânica e Paleobotânica (Univates).

**Tabela 1. Espécies vegetais, número de registro e partes utilizadas na obtenção dos óleos essenciais**

Nome comum	Nome científico	Registro <sup>a</sup>	Data de coleta	Parte destilada
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> (DC) Stapf.	HVAT 2605	17/02/10	Folhas
Eucalipto	<i>Eucalyptus paniculata</i>	HVAT 2599	15/03/10	Folhas
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	HVAT 2601	29/10/09	Folhas e sumidades floridas

<sup>a</sup>Fonte: Herbário do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES (HVAT, Lajeado, RS)

Os óleos essenciais foram extraídos a partir das partes áreas pelo processo de destilação a vapor, usando-se um equipamento em escala-piloto fabricado em aço inoxidável. Cerca de 5 Kg do material vegetal fresco foram acondicionados no sistema de extração e o processo foi acompanhado por 2 horas. O conteúdo condensado foi reunido e transferido para funil de separação, onde o óleo essencial foi obtido pela separação espontânea das fases. A fase superior foi coletada em tubo de Falcon de 50 mL contendo 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 5 °C. O óleo obtido como um líquido límpido foi transferido para frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração a 4°C.

## 2.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

Em balão volumétrico de 10 mL, 100 µL do óleo essencial foram dissolvidos em diclorometano SupraSolv (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Uma alíquota de 2 mL desta solução de óleo essencial 1% foi transferida para frasco de 2 ml e armazenada sob refrigeração.

### 2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG/DIC)

A solução da amostra foi analisada pela injeção de 1µL em um cromatógrafo CG Varian CP-3800 (Walnut Creek, CA, USA), equipado com injetor split/splitless (razão 1:10), uma coluna capilar Rtx-5MS com 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA), um detector de ionização de chama (FID) e um amostrador automático Varian CP 8410 (Walnut Creek, CA, USA). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 50 °C por 2 minutos, aumento na razão de 2 °C/minuto até 220 °C, onde permaneceu por 3 minutos. Temperatura do injetor: 240 °C. Temperatura do detector: 240 °C. Nitrogênio N-50 (Alphagaz, V. Carioca, SP, BR) foi usado como gás de arraste a 1,2 mL/min. A quantificação foi realizada por normalização de área, sendo que foram considerados somente os picos maiores de 0,15%. As análises foram realizadas em triplicata. As análises foram realizadas sob as mesmas condições com uma coluna capilar Rtx-WAX de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA).

Para o cálculo dos índices de retenção, injetou-se uma amostra padrão de solução de hidrocarbonetos C7-C30 *Saturated Alkanes Std* (Supelco analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), os quais foram analisados com a mesma programação do equipamento que as amostras. A partir dos resultados dos tempos de retenção das substâncias desta amostra padrão, calculou-se o índice de retenção (IR) de cada substância utilizando-se a fórmula de Van den Dool e Kratz:

$$IR = 100n + \frac{100(T_x - T_n)}{T_{n+1} - T_n}$$

Onde: T<sub>n</sub> e T<sub>n+1</sub> são os tempos de retenção dos n-alcenos de referência;  
 n é o número de carbonos do n-alceno de referência;  
 T<sub>x</sub> é o tempo de retenção da substância de interesse.

### 2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

A solução da amostra foi analisada pela injeção de 1µL em um cromatógrafo CG 2010 SHIMADZU (Tóquio, Japão), equipado com injetor split/splitless (razão 1:10), uma coluna capilar Rtx-5MS 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA), acoplado a um

espectrômetro de massas CGMS-QP 2010 SHIMADZU (Tóquio, Japão). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 50 °C por 2 minutos, aumento na razão de 2 °C/minuto até 220 °C, onde permaneceu por 3 minutos. A temperatura do injetor, da fonte de íons e da interface foram de 240 °C, 200 °C e 220 °C, respectivamente. Hélio Ultra Puro (Linde Gás, Jundiaí, SP, BR) foi usado como gás de arraste, a 1,2 mL/minuto. O espectrômetro de massas foi operado no modo *scan*, ionização por impacto eletrônico a 70 eV, com intervalo de varredura na faixa de m/z 35-350 u.m.a., em ciclos de 0,5 s. A identificação dos picos foi feita com o auxílio da biblioteca informatizada de espectros de massas (NIST 05) e sequência de eluição. As análises foram realizadas sob as mesmas condições com uma coluna capilar Rtx-WAX de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA).

## 2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 2.5.1 Culturas bacterianas

Os óleos essenciais foram testados frente a 11 espécies de bactérias, sendo cinco espécies Gram-positivas e seis espécies Gram-negativas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

As cepas foram mantidas a -20°C nos meios de cultura apropriados adicionados de 10% de glicerol, e repicadas a cada 15 dias para tubos inclinados de ágar triptose de soja (TSA), mantidos a 4°C.

### 2.5.2 Detecção da atividade antimicrobiana – ensaio de difusão em disco

A detecção de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre as bactérias testadas foi realizada através do método de difusão em disco (CLSI, 2009a), com adaptações. As culturas em TSA foram repicadas para ágar sangue e incubadas a 35°C por 12-18h, a fim de verificar-se a morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir destas placas, tomou-se de 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para

caldo triptose de soja (TSB), incubado a 35°C por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/ml, em solução salina, e esta suspensão foi utilizada para inocular placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, utilizando-se *swab* estéril.

Discos de papel filtro estéreis (9 mm de diâmetro e 250 g/m<sup>2</sup>) foram impregnados com 25µL de óleo essencial puro e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a 36°C por 18-24 h. Discos comerciais de ampicilina (10 µg/disco) e cloranfenicol (30 µg/disco) foram utilizados como antibióticos de referência.

O diâmetro da zona de inibição foi medido, em milímetros, e a inibição foi classificada em forte, moderada ou fraca conforme Carovic-Stanko et al. (2010). O ensaio foi realizado em quadruplicata e o valor apresentado como a média (± desvio padrão).

### **2.5.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)**

Os óleos essenciais foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) para as espécies bacterianas que se mostraram sensíveis no teste de difusão em disco. A CMI foi determinada através do método de microdiluição (CLSI, 2009b), com modificações. O inóculo foi preparado conforme descrito no item 2.5.2.

Os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). A pureza das suspensões de inóculo foi verificada através da inoculação simultânea em ágar não seletivo. As placas foram incubadas a 36°C por 18h e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5

trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento microbiano (SMÂNIA JR. et al., 1995).

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada com base na metodologia proposta por Celiktas et al. (2007), a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10 $\mu$ L) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36°C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada óleo essencial que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes à avaliação da atividade antimicrobiana (teste de difusão em disco) foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ) para cada espécie de bactéria, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a composição dos óleos essenciais avaliados, determinada por cromatografia gasosa (CG/DIC e CG/EM). Neste estudo, foi possível identificar 61 compostos, que representaram de 94,87 a 97,49% da composição dos óleos voláteis.

A Tabela 3 apresenta a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, avaliada através do teste de difusão em disco. Os três óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana, contra diferentes espécies de bactérias e em diferentes intensidades. A CMI e a CMB foram determinadas para as espécies bacterianas que se mostraram sensíveis no teste de difusão em disco. Conforme pode ser observado na Tabela 4, os valores de CMI situaram-se entre 0,075 e  $>10$  mg/mL e os de CMB entre 0,31 e  $>10$  mg/mL.

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia***

Composto <sup>a</sup>	RIE <sup>b</sup>	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
$\alpha$ -Tujeno	924	-	-	0,27
$\alpha$ -Pineno	930	-	55,47	3,24
Canfeno	944	-	0,54	0,91
Sabineno	970	-	-	0,39
$\beta$ -Pineno	972	-	-	5,04
1-Octen-3-ol	981	-	-	0,31
$\beta$ -Mirceno	991	-	-	0,80
$\alpha$ - Felandreno	1004	-	0,24	-
o-Cimeno	1022	-	11,78	0,49
(+)-Silvestreno	1026	-	-	2,39
D-Limoneno	1026	2,89	2,08	-
1,8-Cineol	1028	-	5,61	46,78
$\gamma$ -Terpineno	1056	-	15,84	0,13
Fenchona	1086	-	-	7,94
Linalol	1102	0,66	0,18	3,03
Fenchol	1113	-	0,28	2,78
<i>trans</i> -Pinocarveol	1137	-	-	0,99
Cânfora	1141	-	-	13,71
Isopulegol	1144	0,29	-	-
<i>trans</i> -Verbenol	1145	-	-	0,17
Citronelal	1154	41,80	-	-
Pinocarvona	1160	-	-	0,51
Borneol	1165	-	0,52	0,53
Terpinen-4-ol	1176	-	0,35	0,38
Criptona	1186	-	-	0,38
$\alpha$ -Terpineol	1191	-	0,75	0,87
Mirtenal	1194	-	-	0,74
Mirtenol	1197	-	-	0,38
Verbenona	1209	-	-	0,15
$\beta$ -Citronelol	1233	10,44	-	-
<i>cis</i> -Carveol	1221	-	0,14	-
Neral	1242	0,65	-	-
Carvona	1244	-	-	0,23

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia* (continuação)**

Composto <sup>a</sup>	RIE <sup>b</sup>	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
Geraniol	1259	19,63	-	-
Geranial	1273	0,75	-	-
Acetato de citronelila	1356	2,64	-	-
Acetato de $\alpha$ -Terpinila	1249	-	0,17	-
Eugenol	1359	0,80	-	-
Acetato de geranila	1387	5,50	-	-
$\beta$ -Cariofileno	1413	-	0,15	0,20
Aromadendreno	1433	-	0,28	-
$\alpha$ -Bergamoteno	1433	-	-	0,23
$\beta$ -( <i>E</i> )-Farneseno	1457	-	-	0,16
Germacreno D	1476	1,25	-	-
$\gamma$ -Selineno	1480	-	-	0,57
$\beta$ -Elemeno	1492	-	-	0,13
$\alpha$ -Muroloeno	1499	0,92	-	-
$\beta$ -Bisaboleno	1507	-	-	0,27
$\delta$ -Cadineno	1520	0,82	-	-
$\beta$ -Elemol	1548	2,48	-	-
Germacreno D-4-ol	1572	2,79	-	-
Spatulenol	1574	-	0,19	-
Óxido de cariofileno	1577	-	-	0,59
Globulol	1587	-	0,12	-
Veridiflorol	1587	-	0,18	-
$\tau$ -Murolol	1639	0,87	-	-
$\beta$ -Eudesmol	1646	0,34	-	0,18
Óxido de $\alpha$ -Bisabolol A	1651	-	-	0,17
$\alpha$ -Cadinol	1652	1,29	-	-
$\alpha$ -Bisabolol	1683	-	-	1,45
( <i>E,E</i> )-Farnesol	1724	0,21	-	-
Total identificado (%)		97,02	94,87	97,49
Monoterpenos hidrocarbonados		2,89	85,95	13,66
Monoterpenos oxigenados		82,36	8,00	79,57

**Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia* (continuação)**

Composto <sup>a</sup>	RIE <sup>b</sup>	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)
Sesquiterpenos hidrocarbonados		2,99	0,43	1,56
Sesquiterpenos oxigenados		7,98	0,49	2,39
Rendimento (% p/p material fresco)		0,48	0,25	0,19
Matéria seca (%)		24,72	31,42	26,40

<sup>a</sup>Os compostos estão listados em ordem de eluição da coluna Rtx-5MS; <sup>b</sup>Índice de retenção determinado experimentalmente na coluna Rtx-5MS utilizando-se uma série homóloga de alcanos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>

O óleo essencial de citronela apresentou, no ensaio de difusão em disco, as maiores zonas de inibição observadas para as espécies Gram-positivas *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *B. subtilis*, sendo a atividade contra *S. aureus* estatisticamente equivalente à da ampicilina ( $p < 0,05$ ). Para *L. monocytogenes*, importante patógeno alimentar, a atividade antibacteriana foi equivalente ao cloranfenicol ( $p < 0,05$ ) e semelhante à ampicilina. Este óleo apresentou ainda excepcional atividade contra as espécies de *Bacillus* testadas, com zonas de inibição significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos antibióticos de referência utilizados. A forte atividade apresentada pelo óleo essencial de citronela no ensaio de difusão em disco foi confirmada no ensaio de microdiluição, em que este óleo apresentou as maiores atividades (menores valores de CMI e CMB) frente às bactérias Gram-positivas testadas (Tabela 4).

**Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia*, detectada através do teste de difusão em disco (mm)<sup>a</sup>**

	<i>C. winterianus</i> (Citronela)	<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)	<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>S.aureus</i>	33,7 ± 1,5 a	22,9 ± 0,5 c	21,6 ± 1,4 c	36,4 ± 1,8 a	26,1 ± 0,5 b
<i>E.faecalis</i>	17,7 ± 0,6 c	16,0 ± 0,6 d	15,6 ± 0,7 d	27,0 ± 0,4 a	23,6 ± 0,2 b
<i>L. monocytogenes</i>	28,0 ± 1,6 b	21,5 ± 1,3 c	13,2 ± 0,5 d	31,1 ± 0,9 a	28,4 ± 1,0 b
<i>B.cereus</i>	50,7 ± 2,5 a	22,4 ± 1,2 c	14,0 ± 0,0 d	12,1 ± 0,2 d	27,9 ± 0,7 b
<i>B.subtilis</i>	85,0 ± 0,0 a	22,5 ± 1,1 c	15,9 ± 0,6 d	31,1 ± 1,8 b	29,9 ± 0,5 b
<i>Y. enterocolitica</i>	13,9 ± 0,6 d	14,0 ± 0,4 d	19,6 ± 1,3 c	21,7 ± 0,5 b	28,1 ± 0,5 a
<i>E.coli</i>	nd	nd	15,5 ± 0,8 c	18,9 ± 0,5 b	26,1 ± 0,6 a
<i>S.Typhimurium</i>	nd	nd	11,7 ± 0,3 c	27,1 ± 0,5 a	24,4 ± 0,5 b
<i>E.aerogenes</i>	nd	nd	12,6 ± 0,2 b	nd	23,0 ± 0,7 a
<i>P.vulgaris</i>	18,5 ± 0,6 c	19,6 ± 0,5 bc	19,5 ± 1,0 bc	21,1 ± 1,0 ab	22,4 ± 0,8 a
<i>P.aeruginosa</i>	nd	11,2 ± 0,3	nd	nd	nd

<sup>a</sup> Zona de inibição incluindo o diâmetro do disco, de 9mm. Os dados referem-se à média de quatro replicatas ± desvio padrão. Graus de inibição: 10 -13,9 mm: fraca; 14-18 mm: moderada; >18 mm: forte. Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não são significativamente diferentes (p<0,05). nd: não detectada.

**Tabela 4. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais de *C. winterianus*, *E. paniculata* e *L. angustifolia* (mg/mL)<sup>a</sup>**

	<i>C. winterianus</i> (Citronela)		<i>E. paniculata</i> (Eucalipto)		<i>L. angustifolia</i> (Lavanda)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S.aureus</i>	0,62	2,5	1,25	>10	1,25	5,0
<i>E.faecalis</i>	0,075	5,0	0,075	>10	0,075	>10
<i>L.monocytogenes</i>	0,62	2,5	1,25	>10	1,25	5,0
<i>B.cereus</i>	0,075	2,5	1,25	>10	0,62	2,5
<i>B.subtilis</i>	0,075	1,25	1,25	>10	1,25	2,5
<i>Y.enterocolitica</i>	0,075	0,31	0,075	>10	0,075	2,5
<i>E.coli</i>	na <sup>b</sup>	na	na	na	2,5	2,5
<i>S.Typhimurium</i>	na	na	na	na	1,25	>10
<i>E.aerogenes</i>	na	na	na	na	>10	>10
<i>P.vulgaris</i>	0,31	1,25	0,62	2,5	0,62	1,25
<i>P. aeruginosa</i>	na	na	2,5	5,0	na	na

<sup>a</sup> Os testes foram realizados em triplicata e os resultados referem-se aos valores modais. <sup>b</sup> na: não aplicável, devido a não detecção de atividade antimicrobiana no teste prévio de difusão em disco.

Os resultados do presente estudo concordam em parte com aqueles apresentados por Scherer et al. (2009), que, avaliando a atividade antimicrobiana de um óleo essencial de citronela de composição química majoritária semelhante à do presente estudo, encontraram valores de CMI para *S. aureus* na faixa de 0,600 a 0,800 mg/mL, compatível com o valor encontrado no presente trabalho. Por outro lado, diferentemente dos autores citados, não detectamos atividade inibitória do óleo de citronela contra *E. coli* e *S. Typhimurium*. Em outro trabalho, Duarte et al. (2007) também verificaram atividade inibitória do óleo essencial de citronela contra diversos sorotipos de *E. coli*, porém não apresentam a composição química do óleo em questão, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos. Tipicamente, e também no presente estudo, o composto majoritário (41,8%) deste óleo essencial, citronelal, apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Kim et al. (1995).

A dificuldade em comparar os resultados obtidos por vários autores é frequentemente mencionada (BURT, 2004; PEÑALVER et al., 2005; OUSSALAH et al., 2006; SANTURIO et al., 2007) e é um problema real enfrentado no estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e produtos derivados de plantas em geral, uma vez que existem inúmeras variações nas metodologias utilizadas, desde o método de preparação do inóculo, passando pelo método de inoculação propriamente dito, a forma de aplicação do óleo essencial (puro ou diluído) e, se diluído, o solvente utilizado, até o volume depositado nos discos, o diâmetro dos discos e a gramatura do papel, no caso de testes de difusão em disco. Além disso, conforme apontam Cavanagh e Wilkinson (2002), tanto o método de difusão quanto o de diluição foram desenvolvidos e otimizados para testes de susceptibilidade a antibacterianos de natureza hidrofílica, e os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e insolúveis em água. Assim, ainda segundo os autores citados, há a necessidade da padronização de um método robusto e reproduzível para a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, para que os resultados obtidos por diferentes autores sejam passíveis de comparação.

O óleo essencial de eucalipto apresentou atividade forte a moderada (Tabela 3) contra as bactérias Gram-positivas testadas, entretanto foi menos ativo contra este grupo de bactérias do que o óleo essencial de citronela, o que pode ser verificado tanto pelos resultados do ensaio de difusão em disco quanto pelos valores de CMI e CMB determinados. Este óleo essencial destacou-se por apresentar atividade contra *P. aeruginosa*, um micro-organismo que reconhecidamente apresenta resistência a muitos agentes antimicrobianos e desinfetantes (RUSSEL, 1991).

A emergência e disseminação de bactérias antibiótico-resistentes causadoras de infecções é considerada uma importante questão de saúde pública, e o uso extensivo de antibióticos tem contribuído para o aumento deste problema (LAMBERT, 2002). Neste contexto, *P. aeruginosa* é um patógeno frequentemente envolvido em casos de infecções nosocomiais de difícil tratamento, o que torna-se particularmente grave em pacientes imunocomprometidos (BONOMO; SZABO, 2006). Segundo Carmeli et al. (1999), a emergência de resistência em *P. aeruginosa* resulta em graves problemas tais como aumento do tempo de internação e aumento da mortalidade de pacientes hospitalizados. A resistência de *P. aeruginosa* é atribuída a uma

combinação de fatores, como sua resistência intrínseca (baixa permeabilidade da parede celular), a habilidade de adquirir genes de resistência de outros organismos através de plasmídeos, transposons e bacteriófagos, a secreção de  $\beta$ -lactamases e outras enzimas, a baixa expressão de proteínas da membrana externa (porinas) e a atuação de bombas de efluxo (LAMBERT, 2002; BONOMO; SZABO, 2006). Algumas cepas já apresentam resistência a todos os antibióticos disponíveis, e este problema tende a aumentar (LIVERMORE, 2002).

A resistência de *P. aeruginosa* a diversos antimicrobianos derivados de plantas também tem sido reportada (BURT, 2004), embora alguns estudos detectem susceptibilidade a certos óleos essenciais, como por exemplo aos óleos de alecrim e manjeriço, além de outras espécies vegetais do gênero *Ocimum* (CELIK TAS et al., 2007; RUNYORO et al., 2010). De acordo com Rahman e Kang (2009), o risco de que micro-organismos patogênicos venham a desenvolver resistência aos óleos essenciais é muito baixo, uma vez que estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas, que atuam através de diversos mecanismos. Esta é uma característica vantajosa dos óleos essenciais sobre outros agentes antimicrobianos, que pode trazer benefícios nas diversas áreas passíveis de aplicação. No presente estudo, os valores de CMI e CMB indicam que a utilização do óleo essencial de eucalipto (*E. paniculata*) nas concentrações de 0,25% e 0,5% resulta em atividade bacteriostática e bactericida, respectivamente, contra *P. aeruginosa*, o que pode vir a ser útil na desinfecção de ambientes e utensílios, por exemplo. A atividade antibacteriana apresentada pode ser explicada pela presença, entre outros constituintes, do composto majoritário  $\alpha$ -pineno (55,47%), que apresenta comprovada atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SOKOVIC et al., 2008).

O óleo essencial de lavanda apresentou o maior espectro de ação dentre os óleos essenciais avaliados, tendo sido detectada, no ensaio de difusão em disco (Tabela 3), atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados, com exceção de *P. aeruginosa*. Dentre os três óleos essenciais estudados, foi o único a apresentar atividade inibitória para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. aerogenes*. O principal constituinte identificado neste óleo essencial foi o 1,8-cineol (46,78%), previamente reportado como o composto majoritário (65,4%) do óleo essencial obtido a partir das folhas desta espécie de lavanda (HAJHASHEMI et al., 2003). Este composto demonstrou ser ativo quando testado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Sokovic et al. (2008) e van Vuuren e Viljoen (2007).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. De modo geral, entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (SHYLAJA; PETER, 2004). Cox et al. (2001) avaliaram o mecanismo de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, constituído na sua maior parte por monoterpenos cíclicos, sobre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os autores constataram que os efeitos inibitórios do óleo essencial são consistentes com a partição dos constituintes monoterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes microrganismos. Oyedemi et al. (2009) reportam ainda a perda de conteúdo celular, como lipídios e proteínas, como efeitos de alguns componentes de óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Em conclusão, com relação às bactérias Gram-positivas testadas, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais avaliados, em ordem decrescente, apresentou-se da seguinte forma: citronela > lavanda > eucalipto. Já para as espécies Gram-negativas, a atividade inibitória dos óleos essenciais pode ser classificada na seguinte ordem: lavanda > eucalipto > citronela. Além disso, na escolha de um óleo essencial para uma determinada aplicação, é importante que seja levado em consideração o micro-organismo de interesse, uma vez que a atividade inibitória foi diferente entre as espécies de um mesmo grupo.

#### 4 REFERÊNCIAS

BONOMO, R. A.; SZABO, D. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. S49-56, 2006.

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

CARMELI, Y. et al. Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, p1127-1132, 1999.

CAROVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CAVANAGH, H. M. A.; WILKINSON, J. M. Biological activities of lavender essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 301-308, 2002.

CAVANAGH, H. M. A.; WILKINSON, J. M. Lavender essential oil: a review. **Australian infection control**, v. 10, n. 1, p. 35-37, 2005.

CELIKTAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Tenth Edition**. CLSI document M2-A10 [ISBN 1-56238-688-3]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009b.

COX, S. D. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

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

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

ESTANISLAU, A. A. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 95-10, 2001.

GILLES, M. et al. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v. 119, p. 731-737, 2010.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 67-71, 2003.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 95, n. 41, p. 22-26, 2002.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 634-640, 2002.

MATTOS, S. H. et al. **Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2007. 108 p.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629-636, 2005.

NERIO, L. S.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. Repellent activity of essential oils: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 372-378, 2010.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G.; AKISSUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 2005. 412 p.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

OUSSALAH, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v. 73, p. 236-244, 2006.

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

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1280-1286, 2009.

PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica - APMIS**, v. 113, p. 1-6, 2005.

RAHMAN, A.; KANG, S. inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 176–189, 2009.

ROLLER, S.; ERNEST, N.; BUCKLE, J. The antimicrobial activity of high necrodane and other lavender oils on methicilin-sensitive and – resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 15, n. 3, p. 275-279, 2009.

RUNYORO, D. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. **Food Chemistry**, v. 119, p. 311-316, 2010.

RUSSEL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 71, p. 191-201, 1991.

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

SARTORELLI, P. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 231-233, 2007.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SHASANY, A. K. et al. Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 47, p. 553-559, 2000.

SHYLAJA, M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: **Handbook of herbs and spices**. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 360 p.

SILVA JUNIOR, A. A. *Essentia herba – Plantas bioativas*. Florianópolis: Epagri, 2003, 441 p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. Da UFRGS; Florianópolis: Ed. Da UFSC, 2007. 1102 p.

SMÂNIA JR., A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

SOKOVIC, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. **Food**, v. 1, n. 2, p. 220-226, 2008.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v. 22, p. 1707-1714, 2011.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 540-544, 2007.

## **CAPÍTULO 4**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FONTES POTENCIAIS DE AGENTES CONSERVADORES NATURAIS PARA ALIMENTOS**



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FONTES POTENCIAIS DE AGENTES CONSERVADORES NATURAIS PARA ALIMENTOS

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos provenientes de 12 espécies vegetais de ocorrência na região Sul do Brasil. Para tanto, foi determinado o teor de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais de extratos e a atividade antioxidante foi avaliada utilizando-se três metodologias distintas. A atividade antimicrobiana foi detectada através do método de difusão em disco frente a 12 espécies de bactérias de importância em alimentos. A CMI e CMB foram determinadas para os extratos mais ativos pelo método de microdiluição. O extrato de *Campomanesia eugenioides* (guabiroba) foi o mais ativo contra as bactérias Gram-positivas testadas, enquanto o extrato da casca de *Parapiptadenia rigida* (angico vermelho) apresentou a maior atividade contra as bactérias Gram-negativas avaliadas, com valores de CMI e CMB de 0,075 e 0,62 mg/mL contra *Pseudomonas aeruginosa*. Esses dois extratos também apresentaram alto teor de compostos fenólicos e elevada capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS. O extrato de *C. eugenioides* também apresentou uma elevada capacidade de complexação com o  $Fe^{2+}$ . Os resultados de presente trabalho demonstram que, dentre os extratos avaliados, aqueles provenientes de *P. rigida* (casca) e *C. eugenioides*, ambas espécies nativas do Brasil, apresentaram o maior potencial para aplicação como agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais em alimentos.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, extratos vegetais, *Campomanesia eugenioides*, *Parapiptadenia rigida*, aditivos naturais.

### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of extracts derived from 12 plant species

growing in the South of Brazil. Total phenolic and total flavonoid compounds were determined. Antioxidant activity was evaluated using three different methodologies, and antimicrobial activity against 12 food-related bacterial species was detected using the disc-diffusion method. CMI and CMB were determined in the extracts shown to be more active in the disc-diffusion test by the microdilution method. *Campomanesia eugenioides* extract was the most active against the tested Gram-positive bacteria, whereas *Parapiptadenia rigida* bark extract presented the highest activity against the evaluated Gram-negative bacteria (CMI and CMB of 0.075 and 0.62 mg/mL against *Pseudomonas aeruginosa*). Those two extracts also presented high phenolic content and high DPPH and ABTS radical scavenging ability. *C. eugenioides* extract presented high Fe<sup>2+</sup> chelating capacity. The results of the present study demonstrate that, among the evaluated extracts, *P. rigida* bark and *C. eugenioides*, both Brazilian native species presented the highest potential of application as natural antimicrobial and antioxidant agents.

**Keywords:** antimicrobial activity, antioxidant activity, plant extracts, *Campomanesia eugenioides*, *Parapiptadenia rigida*, natural additives.

## 1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem dentre seus principais desafios a minimização das alterações químicas, a inibição da deterioração microbiana e o controle da contaminação por micro-organismos patogênicos. Apesar do desenvolvimento de diversos métodos para a conservação dos alimentos, as doenças de origem alimentar constituem, ainda nos dias de hoje, um sério problema de saúde pública no mundo todo (CELIK TAS et al., 2007). Vários fatores contribuem para a crescente importância dada a estas enfermidades, como uma maior variedade de alimentos, incluindo aqueles prontos para o consumo, a produção em massa e a distribuição internacional dos alimentos. A prevalência de patógenos antibiótico-resistentes também deve ser considerada (EBRAHIMABADI et al., 2010).

Por outro lado, a oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração da qualidade dos alimentos, levando ao aparecimento de odores e sabores desagradáveis, além de reduzir a qualidade nutricional e dar origem a produtos de oxidação potencialmente tóxicos (OWUSU-APENTEN, 2005). A fim de controlar tal processo a indústria

alimentícia geralmente lança mão do uso de antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), contudo, a aplicação dessas substâncias tem sido questionada devido às suas atividades carcinogênicas e mutagênicas (KAHL; KAPUS, 1993). Devido às questões de toxicidade e à preferência dos consumidores por alimentos mais naturais e saudáveis, verifica-se atualmente um interesse crescente na busca por aditivos naturais capazes de preservar os alimentos das alterações indesejáveis (DUDONNÉ et al., 2010). Desta forma, os aditivos naturais derivados de plantas tornaram-se um conveniente atrativo para a indústria alimentícia. Os benefícios de sua aplicação podem ir desde o favorecimento da conservação dos alimentos até a inclusão de fatores nutricionais suplementares e propriedades benéficas à saúde (SINGH et al., 2007). Assim, o acesso a produtos vegetais que apresentem ao mesmo tempo propriedades antimicrobianas e antioxidantes é considerado um dos maiores objetivos no campo de pesquisa em aditivos para alimentos (SINGH et al., 2007; EBRAHIMABADI et al., 2010).

Muitas espécies vegetais de uso medicinal consagrado são fontes importantes de compostos bioativos, e podem ser consideradas uma fonte potencial de aditivos naturais para a indústria de alimentos (CAO et al., 2009). Frequentemente, encontram-se diferenças significativas nas atividades antioxidante e antimicrobiana reportadas para extratos provenientes de uma mesma espécie vegetal. As razões para esta variabilidade podem residir nas diferentes localizações geográficas de cultivo, época de colheita, genótipo e condições climáticas (CELIK TAS et al., 2007), entre outras. Desta forma, faz-se necessária a avaliação da atividade biológica de extratos obtidos a partir de plantas de uma determinada região.

Os objetivos deste trabalho foram: (1) determinar o teor de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais de extratos derivados de 12 espécies de plantas; (2) avaliar a atividade antioxidante dos extratos através de três metodologias distintas e (3) avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro*, contra 12 espécies de micro-organismos de importância em alimentos, visando identificar as espécies mais promissoras para a aplicação como conservantes e antioxidantes naturais em alimentos. Além disso, o trabalho busca contribuir para o conhecimento, utilização e valoração da biodiversidade nacional, baseado no uso racional e sustentável de seus recursos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O material vegetal foi coletado na cidade de Concórdia – SC, Brasil (27°14' 2" S, 52°1'40" W), no período de setembro de 2009 a abril de 2010. A identificação botânica das espécies vegetais foi realizada pelo Dr. A. Jasper (Univates, RS, Brasil) e pelos Drs. S. J. Longhi, M. C. Scipioni e A. R. T. Nascimento (UFSM, RS, Brasil). As exsiccatas das espécies vegetais (Tabela 1) foram depositadas no Herbário do Museu de Ciências Naturais do Departamento de Botânica e Paleobotânica (Univates) e no Herbário Florestal do Laboratório de Dendrologia do Departamento de Ciências Florestais (UFSM).

**Tabela 1. Identificação das espécies vegetais, registro e parte utilizada para a extração**

Nome comum	Nome científico	Registro <sup>a</sup>	Data de coleta	Parte utilizada <sup>b</sup>
Abacate	<i>Persea Americana</i> Mill.	HVAT 2606	24/04/2010	F
Angico vermelho	<i>Parapiptadenia rigida</i>	HVAT 2608	15/03/2010	F/C
Araçá	<i>Psidium cattleyanum</i> Sabine	HDCF 5530	22/09/2009	F
Aroeira	<i>Schinus terebinthifolius</i>	HVAT 2607	15/03/2010	F
Bardana	<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh	HVAT 2609	30/10/2009	F
Cambucá	<i>Plinia edulis</i> (Vell.) Sobral	HDCF 5579	11/12/2009	F
Canela	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	HDCF 5538	28/10/2009	C
Caqui	<i>Diospyros kaki</i>	HVAT 2597	15/03/2010	F
Goiaba	<i>Psidium guajava</i> L.	HDCF 5533	26/10/2009	F
Guabiroba	<i>Campomanesia eugenioides</i>	HVAT 2612	26/10/2009	F
Jambolão	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	HDCF 5525	11/12/2009	F
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i> L.	HDCF 5534	22/09/2009	F

<sup>a</sup> HVAT: Herbário do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES (Lajeado, RS); HDCF: Herbário Florestal do Laboratório de Dendrologia da UFSM (Santa Maria, RS); <sup>b</sup> F: folha; C: casca

O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar a 40°C por 48 h. Em seguida foi moído e então extraído por maceração exaustiva em solução de etanol:água 80:20 (v/v). O solvente foi destilado a 50°C sob pressão reduzida para obtenção do extrato bruto hidroalcólico. Os extratos foram mantidos sob refrigeração (0-4 °C) em ausência de luz.

## 2.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi determinado conforme Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Uma alíquota de 0,5 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu a 0,2 N. Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL de solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5%. A mistura foi incubada a 25°C por 2 horas e a absorbância foi medida a 760 nm. A quantificação foi baseada em uma curva de calibração de ácido gálico (50-200 mg/L  $y = 0,011x + 0,018$ ;  $r^2 = 0,993$ ). Os resultados estão expressos como mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). A análise foi realizada em triplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

## 2.3 DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

O conteúdo de flavonóides dos extratos foi determinado de acordo com Dewanto et al. (2002). Uma alíquota de 0,25 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 1,25 mL de água deionizada e a 75  $\mu$ L de NaNO<sub>2</sub> 5%. Após 6 minutos, foram adicionados 150  $\mu$ L de AlCl<sub>3</sub> 10% e a mistura foi deixada em repouso por 5 minutos. Então, 0,5 mL de NaOH 1 M e 2,5 mL de água deionizada foram adicionados. Após agitação, a absorbância foi lida a 510 nm e comparada com uma curva de calibração de (+)-catequina (50-200 mg/L  $y = 0,001x - 0,000$ ;  $r^2 = 0,998$ ). Os resultados estão expressos como mg equivalente de catequina por grama de extrato (mg EC/g). A análise foi realizada em triplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

#### 2.4 CAPACIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL 1,1-DIFENIL-2-PICRIL-HIDRAZIL (DPPH)

A capacidade de sequestro do radical DPPH foi avaliada conforme Brand-Willians, Cuvelier and Berset (1995). Uma alíquota de 0,1 mL da solução do extrato adequadamente diluída foi misturada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,06 mM. A mistura foi agitada vigorosamente e incubada a 25 °C por 60 minutos em ausência de luz. O decréscimo da absorbância de cada solução foi então medido a 515 nm. A capacidade de sequestro do radical DPPH foi calculada de acordo com a equação: Capacidade de sequestro de radical DPPH (%) =  $[(A_0 - A_1)/A_0]100$ , onde  $A_0$  é a absorbância do controle e  $A_1$  é a absorbância na presença do extrato. Os resultados foram plotados em gráfico de inibição versus concentração e os valores das concentrações capazes de prover 50% de inibição (IC<sub>50</sub>) foram estimados de acordo com a equação da curva baseada em modelo sigmoidal. Ácido gálico, (+)-catequina e BHA foram utilizados como controles positivos. A análise foi realizada em triplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

#### 2.5 CAPACIDADE DE SEQUESTRO DO RADICAL 2,2'-AZINOBIS-(3-ETILBENZOTIAZOLINA-6-ÁCIDO SULFÔNICO (ABTS)

A capacidade de sequestro do radical ABTS foi determinada de acordo com a metodologia preconizada por Re et al. (1998). O radical ABTS foi gerado pela reação de uma solução aquosa de ABTS a 7 mmol/L com K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (concentração final de 2,45 mmol/L) em ausência de luz por 12-16 h. Antes do uso, esta solução foi diluída com etanol para resultar em uma absorbância de 0,70 $\pm$ 0,02 a 734 nm e equilibrada a 30 °C. Da mesma forma, a solução do extrato foi diluída de forma a produzir uma inibição entre 20-80% em relação ao branco. Então, uma alíquota de 10  $\mu$ L da solução do extrato foi misturada com 1 mL da solução diluída de ABTS e a absorbância foi medida a 734 nm de 1-6 minutos. A quantificação foi baseada em uma curva de calibração de Trolox (faixa de 0-2 mmol/L) preparada em etanol absoluto ( $y = 0,295x + 0,678$ ;  $r^2 = 0,999$ ). Os resultados estão expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de extrato ( $\mu$ mol TEAC/g). A análise foi realizada em triplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

## 2.6 CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO COM O $\text{Fe}^{2+}$

O ensaio de determinação da capacidade de complexação com o  $\text{Fe}^{2+}$  foi realizado conforme descrito por Carter (1971), com adaptações. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do extrato devidamente diluído a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi misturada com 50  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2 mmol/L e 1850  $\mu\text{L}$  de metanol. Após 5 minutos de incubação a 25 °C, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de ferrozina a 5 mmol/L e a mistura permaneceu em repouso por 10 minutos a 25 °C. A absorbância da solução foi medida a 562 nm. A capacidade de de complexação foi calculada de acordo com a equação:  $\text{CC-Ferro} = [(A_0 - A_I)/A_0]100$ , onde  $A_0$  é a absorbância do branco e  $A_I$  é a absorbância na presença do extrato. Ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) foi utilizado como controle positivo. A análise foi realizada em triplicata.

## 2.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 2.7.1 Culturas bacterianas

Os extratos vegetais foram testados frente a 12 espécies de bactérias, sendo seis espécies Gram-positivas e seis espécies Gram-negativas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

As cepas foram mantidas a -20 °C nos meios de cultura apropriados adicionados de 10% de glicerol, e repicadas a cada 15 dias para tubos inclinados de ágar triptose de soja (TSA), mantidos a 4 °C.

### 2.7.2 Detecção da atividade antimicrobiana – ensaio de difusão em disco

A detecção de atividade antimicrobiana dos extratos sobre as bactérias testadas foi realizada através do método de difusão em disco (CLSI, 2009a), com a seguinte modificação: com exceção de *L. plantarum*, que foi inoculado a partir de uma suspensão de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL para uma adequada formação do “tapete”

de células, foram utilizadas suspensões de aproximadamente  $10^7$  UFC/mL para inocular as placas de ágar. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente  $10^7$  UFC/ml, em solução salina, e esta suspensão foi utilizada para inocular placas de ágar Mueller-Hinton, utilizando-se *swab* estéril. Os extratos foram diluídos a 100 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Discos de papel filtro estéreis (9 mm de diâmetro e 250 g/m<sup>2</sup>) foram impregnados com 25µL de cada extrato diluído e depositados sobre as placas inoculadas, incubadas a 36 °C por 18-24 h. Discos comerciais de ampicilina (10 µg/disco) e cloranfenicol (30 µg/disco) foram utilizados como controles positivos, e discos impregnados de DMSO (25µL) como controles negativos. O diâmetro da zona de inibição foi medido, em milímetros, e a inibição foi classificada em forte, moderada ou fraca conforme Carovic-Stanko et al. (2010). O ensaio foi realizado em quadruplicata e o valor apresentado como a média ( $\pm$  desvio padrão).

### **2.7.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)**

Os extratos que se mostraram mais ativos no ensaio de difusão em disco foram avaliados quanto à concentração mínima inibitória (CMI), através do método de microdiluição (CLSI, 2009b), com modificações.

Foram testadas 6 espécies de bactérias, três Gram-positivas e três Gram-negativas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. O inóculo foi preparado conforme descrito no item 2.7.2.

Os extratos foram diluídos em DMSO à concentração de 100mg/mL. A seguir, foram preparadas séries de diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton.

Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100µL de cada solução diluída e 5 µL da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO e inóculo). A pureza das suspensões de inóculo foi verificada através da

inoculação simultânea em ágar não seletivo. As placas foram incubadas a 36 °C por 18h e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu totalmente o crescimento microbiano (SMÂNIA JR. et al., 1995).

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada com base na metodologia proposta por Celiktas et al. (2007), a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10µL) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36°C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada extrato que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

## 2.8 ESTATÍSTICA

Os dados obtidos no teste de difusão em disco foram submetidos à análise de variância ( $p < 0,05$ ) para cada espécie de bactéria, e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman ( $p < 0,05$ ) entre todos os parâmetros avaliados, através do procedimento CORR do pacote estatístico SAS (SAS, 2003).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS

A Tabela 2 apresenta o conteúdo de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos avaliados.

**Tabela 2. Conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides totais dos extratos hidroalcoólicos avaliados**

Espécie vegetal	Nome comum	Fenólicos totais (mg EAG/g extrato) <sup>a</sup>	Flavonóides totais (mg EC/g extrato) <sup>b</sup>
<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh	Bardana	48,38 ± 0,76	43,79 ± 1,64
<i>Campomanesia eugenoides</i>	Guabiroba	199,46 ± 4,66	63,07 ± 2,34
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	Canela	261,13 ± 3,74	127,57 ± 3,71
<i>Diospyros kaki</i>	Caqui	78,60 ± 4,52	47,60 ± 0,82
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitanga	220,07 ± 13,11	38,67 ± 1,76
<i>Parapiptadenia rigida</i>	Angico (casca)	270,83 ± 2,43	73,52 ± 5,17
<i>Parapiptadenia rigida</i>	Angico (folhas)	150,45 ± 3,29	63,43 ± 3,73
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacate	39,80 ± 1,05	67,83 ± 1,09
<i>Plinia edulis</i> (Vell.) Sobral	Cambucá	298,78 ± 3,10	107,10 ± 8,64
<i>Psidium cattleianum</i> Sabine	Araçá	204,01 ± 3,33	87,81 ± 4,59
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiaba	125,75 ± 4,32	60,45 ± 2,77
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira	144,39 ± 3,72	99,00 ± 8,42
<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Jambolão	199,99 ± 7,75	47,71 ± 0,94

<sup>a</sup> EAG: equivalente em ácido gálico; <sup>b</sup> EC: equivalente em catequina.

A maioria dos extratos foi caracterizada pela ocorrência de elevados teores de compostos fenólicos. Os valores, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG), variaram de 39,80 a 298,78 mgEAG/g de extrato. Os extratos de *Plinia edulis*, *Parapiptadenia rigida* (casca) e *Cinnamomum zeylanicum*, em ordem decrescente, apresentaram os maiores teores destes compostos (>250 mgEAG/g). *Eugenia uniflora*, *Psidium cattleianum*, *Syzygium cumini* e *Campomanesia eugenoides* também apresentaram alto conteúdo de fenólicos (199,46 - 220,07 mgEAG/g), enquanto os extratos de *P. rigida* (folhas), *Psidium guajava* e *Schinus terebinthifolius* apresentaram teores intermediários (125,75 - 150,45 mgEAG/g). Os extratos de *Diospyros kaki*, *Arctium minus* e *Persea americana* apresentaram os menores teores (39,8 - 78,6 mgEAG/g) destes compostos.

Em um estudo abrangendo extratos aquosos provenientes de 30 espécies diferentes de plantas, Dudonné et al. (2009) reportam teores de fenólicos totais variando entre 6,86 e 397,03 mg GAE/g. De modo semelhante ao presente estudo, o extrato de *C. zeylanicum* situou-se entre os que apresentaram os maiores teores destes compostos (309,23 mg GAE/g). Já Niciforovic et al. (2010) reportam valores de 34 a 413 mg GAE/g para extratos etanólicos e metanólicos provenientes de 6 espécies de plantas (*Balloba nigra* L., *Cotinus coggygria* Scop., *Echium rubrum* L., *E. vulgare* L., *Gentiana asclepiadea* L. e *Halacsya sendtneri* (Boiss.) Dörfel), faixa semelhante à encontrada no presente estudo.

O conteúdo de flavonóides, maior classe de compostos fenólicos vegetais encontrada na natureza, foi expresso em equivalentes de catequina (EC), e variou de 38,67 a 127,57 mg EC/g de extrato. Os extratos de *C. zeylanicum*, *P. edulis*, *S. terebinthifolius* e *P. cattleyanum* apresentaram os maiores teores destes compostos (87,81 – 127,57 mg EC/g). Os extratos de *P. rigida*, *P. americana*, *C. eugenioides* e *P. guajava* apresentaram teores intermediários (60,45 – 73,52), enquanto os extratos de *S. cumini*, *D. kaki*, *A. minus* e *E. uniflora* tiveram as menores concentrações de flavonóides totais (38,67 – 47,71 mg EC/g). Em um estudo prévio, (Martinez-Correa et al., 2011), o conteúdo de flavonóides totais de um extrato etanólico de *E. uniflora* foi de 46,5 mg EC/g, em concordância com o presente estudo.

## 3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 3.2.1 Ensaios de captura de radicais livres

A atividade antioxidante, determinada por um único ensaio, reflete somente a reatividade química sob as condições específicas do ensaio em questão. Por este motivo, aponta-se atualmente a necessidade de utilizar-se mais de um método de avaliação do potencial antioxidante, levando-se em conta os diferentes mecanismos de ação que podem ser desempenhados pelos constituintes de um extrato vegetal (HUANG, OU; PRIOR, 2005).

Os ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS têm sido largamente empregados na determinação das capacidades antioxidantes de extratos vegetais. São ensaios que envolvem uma reação de oxirredução com a transferência de um elétron, tendo o agente oxidante como indicador do ponto final da reação (HUANG; OU; PRIOR, 2005). O DPPH é um radical livre estável que pode ser prontamente reduzido na presença de um agente antioxidante. Sua coloração violeta sofre

alteração para amarelo como resultado da reação, e o grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato.

A quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial do radical DPPH em 50% é chamada concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) (BRAND-WILLIANS et al., 1995). De forma análoga, o radical ABTS (de cor verde-azulada), é descolorido ao ser reduzido por um composto antioxidante. O grau de descoloração também traduz o potencial antioxidante do extrato, calculado relativamente à reatividade do Trolox como padrão, sob as mesmas condições de ensaio (RE et al., 1999). O resultado é expresso como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de extrato ( $\mu\text{mol TEAC/g}$ ).

A atividade antioxidante dos extratos avaliada através da capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS está apresentada na Tabela 3, e seguiu a mesma tendência observada para o teor de compostos fenólicos, onde os extratos de *P. rigida*, *P. edulis*, *C. zeylanicum*, *E. uniflora*, *C. eugenioides* e *P. cattleyanum* apresentaram elevada capacidade de captura destes radicais. Para essas espécies, os valores de CI<sub>50</sub> estiveram compreendidos entre 3,73 e 7,05  $\mu\text{g/mL}$  (DPPH) e entre 1965 e 4218  $\mu\text{mol TEAC/g}$  (ABTS). Os extratos de *S. cumini*, *P. guajava* e *S. terebinthifolius* apresentaram capacidade intermediária de captura dos radicais livres, com valores de CI<sub>50</sub> variando de 8,77 a 10,93  $\mu\text{g/mL}$  e de 1248 a 1717  $\mu\text{mol TEAC/g}$ . Já os extratos de *D. kaki*, *A. minus* e *P. americana* apresentaram as menores capacidades antioxidantes observadas através destes ensaios (CI<sub>50</sub> >25  $\mu\text{g/mL}$  e entre 233 e 619  $\mu\text{mol TEAC/g}$ ).

Vários estudos foram realizados acerca das atividades biológicas de *P. guajava*, incluindo sua atividade antioxidante. Entretanto, diversos trabalhos utilizam a polpa da fruta ou as sementes, e, embora alguns estudos utilizem as folhas da planta, a comparação dos resultados obtidos é difícil, já que a atividade antioxidante pode ser expressa de diferentes formas. Outro fator que contribui para esta dificuldade são as modificações introduzidas nas metodologias, tais como os volumes adicionados das soluções de extrato e/ou de radical livre. Em um estudo prévio (TACHAKITTIRUNGROD; OKONOJI; CHOWWANAPOONPOHN, 2007), foi reportada uma elevada atividade antioxidante (4,91 mM TEAC/mg) para um extrato etanólico obtido a partir das folhas de *P. guajava*, sendo este o extrato mais ativo dentre 24 extratos avaliados no referido estudo. Em outro estudo (QUIAN; NIHORIMBERE, 2004), foi reportado um valor de CI<sub>50</sub> (ensaio do DPPH) de 53 mg/g, que corresponde a uma atividade antioxidante inferior à observada no presente estudo.

**Tabela 3. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos avaliada pelos métodos do DPPH, ABTS e complexação com o Fe<sup>2+</sup>**

Espécie vegetal	Nome Comum	DPPH <sup>a</sup> (CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>b</sup>	ABTS <sup>a</sup> (µmol TEAC/g) <sup>c</sup>	% Complexação com o Fe <sup>2+</sup>
<i>Arctium minus</i> (Hill) Bernh	Bardana	> 25	369 ± 8	43,94
<i>Campomanesia eugenoides</i>	Guabiroba	6,07 ± 0,09	2445 ± 71	71,82
<i>Cynnamomum zeylanicum</i> Blume	Canela	4,34 ± 0,05	2600 ± 64	14,35
<i>Diospyros kaki</i>	Caqui	> 25	619 ± 35	46,71
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Pitanga	5,26 ± 0,14	2600 ± 30	52,11
<i>Parapiptadenia rigida</i>	Angico (casca)	4,56 ± 0,03	4218 ± 83	23,37
<i>Parapiptadenia rigida</i>	Angico (folhas)	7,05 ± 0,07	1965 ± 18	39,23
<i>Persea americana</i> Mill.	Abacate	> 25	233 ± 31	26,87
<i>Plinia edulis</i> (Vell.) Sobral	Cambucá	3,73 ± 0,12	3781 ± 72	69,55
<i>Psidium cattleyanum</i> Sabine	Araçá	5,76 ± 0,19	2107 ± 31	62,12
<i>Psidium guajava</i> L.	Goiaba	10,52 ± 0,26	1248 ± 38	70,16
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeira	10,93 ± 0,11	1406 ± 87	44,19
<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	Jambolão	8,77 ± 0,02	1717 ± 139	54,26
Ácido gálico	-	0,79 ± 0,02	-	-
BHA	-	2,03 ± 0,02	-	-
Catequina	-	1,55 ± 0,04	-	-
EDTA (10 µg/mL)	-	-	-	98,62

<sup>a</sup> Os dados são expressos como a média da triplicata ± DP; <sup>b</sup> DPPH: radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil; CI<sub>50</sub> (concentração inibitória): quantidade de extrato necessária para decrescer a concentração inicial do radical DPPH<sup>•</sup> em 50%; <sup>c</sup> ABTS: radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); µmol TEAC/g: capacidade antioxidante equivalente ao Trolox por grama de extrato.

*E. uniflora* é outra espécie vegetal bastante estudada. Martinez-Correa et al. (2011) reportaram uma  $CI_{50}$  de 6,2  $\mu\text{g/mL}$  para um extrato etanólico desta espécie, valor semelhante ao obtido no presente estudo. Uma atividade mais fraca ( $CI_{50} = 9,1 \mu\text{g/mL}$ ) foi reportada para um extrato metanólico de *E. uniflora* (VELÁZQUEZ et al., 2003). Os mesmos autores determinaram uma  $CI_{50}$  de 8,8  $\mu\text{g/mL}$  para um extrato de *S. terebinthifolius*, também similar ao presente estudo.

Erdemoglu et al. (2009) avaliaram o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante (captura do radical DPPH) de extratos aquosos e alcoólicos de *Arctium minus*. O conteúdo de compostos fenólicos (48,29 mg EC/g) do extrato etanólico foi muito similar ao observado no presente estudo (48,38 mg EC/g), enquanto a  $CI_{50}$  foi de 7,18 mg/mL, o que corresponde a 7180  $\mu\text{g/mL}$  e indica uma fraca atividade de captura do radical livre, o que também foi observado no presente estudo.

Existem vários estudos acerca da atividade antioxidante de *P. americana*, *D. kaki*, *S. cumini* e *P. cattleyanum*, (LUXIMON-RAMMA; BAHORUN; CROZIER, 2003; GU et al., 2008; WANG; BOSTIC; GU, 2010; FARIA; MARQUES; MERCADANTE, 2011). Entretanto, a maioria deles concentra seus estudos na polpa das frutas, na casca ou nas sementes, e não em extratos obtidos a partir das folhas destas espécies. Já com relação às espécies *P. edulis*, *P. rigida* e *C. eugenioides*, não encontramos publicações acerca de sua atividade antioxidante. Desta forma, o presente estudo apresenta novos dados referentes à atividade antioxidante destas espécies vegetais.

### 3.2.2 Capacidade de complexação com o $\text{Fe}^{2+}$

Íons de metais de transição como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  podem atuar na oxidação lipídica como agentes pró-oxidantes. Na presença de peróxido de hidrogênio, o íon metálico ajuda a formar um radical hidroxil altamente reativo, através da reação de Fenton (OWUSU-APENTEN, 2005). Os agentes quelantes, complexando íons metálicos, podem prevenir os processos oxidativos.

O ensaio de capacidade de complexação com o  $\text{Fe}^{2+}$ , também conhecido como ensaio da Ferrozina<sup>®</sup>, busca avaliar a atividade quelante de uma amostra, no caso, os extratos vegetais. A ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-ácido disulfônico, sal sódico) forma um complexo estável com o  $\text{Fe}^{2+}$ , de coloração vermelha. Na presença de outros agentes quelantes, a formação do complexo é

diminuída, resultando em uma redução da coloração vermelha, o que permite estimar a atividade quelante da amostra (YAMAGUCHI et al., 2000).

A capacidade de complexação dos extratos avaliados com o íon  $\text{Fe}^{2+}$  também está apresentada na Tabela 3. Dentre os extratos avaliados, os de *C. eugenoides*, *P. cattleyanum*, *P. guajava* e *P. edulis* apresentaram a maior capacidade de complexação com o  $\text{Fe}^{2+}$  (62,12 – 71,82 %). Diferentemente do que foi observado nos ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS, os extratos da casca de *P. rigida* e *C. zeylanicum* não apresentaram um bom desempenho através da complexação com o íon metálico de transição, apresentando os menores percentuais de complexação (23,37% e 14,35%, respectivamente), o que indica não atuarem através deste mecanismo.

Foi considerado que uma alta capacidade de complexação com o  $\text{Fe}^{2+}$  poderia estar relacionada a um elevado teor de flavonóides (NICIFOROVIC et al., 2010), já que estes compostos possuem várias hidroxilas fenólicas e um grupamento carbonila na posição 4 do anel C, o que poderia representar diversos sítios disponíveis para a complexação do íon metálico (LEOPOLDINI; RUSSO; TOSCANO, 2011). No presente estudo, os extratos de *P. edulis* e *P. cattleyanum* apresentaram níveis elevados de flavonóides e também uma alta capacidade de complexação com o  $\text{Fe}^{2+}$ , o que estaria de acordo com a afirmação acima. Entretanto, os extratos de *P. guajava* e *C. eugenoides*, que também apresentaram elevada capacidade complexante, apresentaram baixo conteúdo de flavonóides. Além disso, o extrato de *C. zeylanicum*, que apresentou o maior teor de flavonóides, não demonstrou uma capacidade quelante significativa, o que sugere que a relação descrita anteriormente pode não ser sempre válida.

### 3.3 CORRELAÇÕES ENTRE O CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, CONTEÚDO DE FLAVONÓIDES TOTAIS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS AVALIADOS

Os compostos fenólicos incluem uma ampla diversidade de estruturas químicas complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Sabe-se que as plantas sintetizam compostos fenólicos através de rotas do metabolismo secundário, que atuam em mecanismos de defesa da planta contra espécies reativas de oxigênio, a fim de evitar danos oxidativos.

Esta atividade antioxidante pode estar relacionada a diversos mecanismos, tais como a captura de radicais livres, a doação de hidrogênio, a inativação do oxigênio singlete, a complexação de íons metálicos e a atuação como substrato para radicais superóxido (NICIFOROVIC et al., 2010).

Foi reportada uma correlação positiva e altamente significante entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante de materiais vegetais (VELIOGLU et al., 1998). No presente estudo, a análise estatística revelou correlações altamente significantes entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos avaliados, tanto pelo método do sequestro do radical DPPH quanto do radical ABTS (Tabela 4). Desta forma, os resultados sugerem que os compostos fenólicos foram o principal grupo que contribuiu para a atividade antioxidante dos extratos avaliados. Os resultados obtidos nos ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS também foram bem correlacionados. Já o ensaio de capacidade de complexação com o  $Fe^{2+}$  não apresentou correlação significante com o teor de compostos fenólicos e nem com os demais métodos utilizados para a avaliação da atividade antioxidante, o que está de acordo com estudos prévios (NICIFOROVIC et al., 2010). O teor de flavonóides também não foi correlacionado com os demais parâmetros avaliados.

**Tabela 4. Coeficientes de correlação de Spearman entre os ensaios realizados**

	DPPH	ABTS	Complexação com o $Fe^{2+}$
<b>ABTS</b>	-0,96266 <sup>a</sup> ( $<0,0001$ ) <sup>b</sup>		
<b>Complexação com o <math>Fe^{2+}</math></b>	-0,05525 <sup>a</sup> (0,8577) <sup>b</sup>	0,03576 <sup>a</sup> (0,9077) <sup>b</sup>	
<b>Fenólicos totais</b>	-0,96687 <sup>a</sup> ( $<0,0001$ ) <sup>b</sup>	0,96561 <sup>a</sup> ( $<0,0001$ ) <sup>b</sup>	0,05495 <sup>a</sup> (0,8585) <sup>b</sup>
<b>Flavonóides totais</b>	-0,49725 <sup>a</sup> (0,0838) <sup>b</sup>	0,40715 <sup>a</sup> (0,1673) <sup>b</sup>	-0,23626 <sup>a</sup> (0,4371) <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Coeficiente de correlação de Spearman ; <sup>b</sup> Nível de significância (*p*)

### 3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA – TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

A atividade antimicrobiana detectada pelo método de difusão em disco está apresentada na Tabela 5.

Os extratos de *C. eugenioides*, *C. zeylanicum*, *E. uniflora*, *P. rigida* (casca e folhas) e *P. edulis* apresentaram a maior atividade e espectro de ação frente às espécies bacterianas testadas.

O extrato de *C. eugenioides* apresentou forte inibição contra *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *P. vulgaris*, com as maiores zonas de inibição observadas para os três últimos micro-organismos, dentre os extratos avaliados. Este extrato apresentou ainda atividade moderada contra *E. faecalis*, *B. subtilis* e *Y. enterocolitica*.

O extrato da casca de *P. rigida* apresentou forte atividade contra *S. aureus* e atividade moderada contra *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris*.

Esse extrato destacou-se por apresentar atividade contra *P. aeruginosa*, espécie sabidamente resistente a muitos agentes antimicrobianos e desinfetantes (RUSSEL, 1991). O extrato obtido a partir das folhas desta planta apresentou atividade moderada contra *S. aureus*, *B. cereus*, *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris* e também foi ativo contra *P. aeruginosa*.

O extrato de *E. uniflora* foi fortemente inibitório para *P. vulgaris*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* e *Y. enterocolitica*, com as duas maiores zonas de inibição apresentadas para os dois últimos micro-organismos.

As espécies Gram-negativas *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. aerogenes*, bem como a espécie Gram-positiva *L. plantarum*, foram as mais resistentes dentre os micro-organismos testados, não sofrendo inibição por nenhum dos extratos avaliados. Já *P. aeruginosa* sofreu inibição apenas pelos extratos de angico-vermelho (casca e folha) e canela. De modo geral, as espécies Gram-positivas foram mais suscetíveis à atividade antimicrobiana dos extratos vegetais avaliados do que as espécies Gram-negativas testadas, o que está de acordo com diversos estudos acerca de agentes antimicrobianos naturais (BURT, 2004).

Os extratos de *P. cattleyanum*, *P. guajava*, *S. cumini* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividade contra vários micro-organismos e em diferentes graus, porém em menor intensidade do que as espécies vegetais citadas anteriormente.

**Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos avaliados no teste de difusão em disco <sup>a</sup>**

Bactéria	<i>A. minus</i> (Bardana)	<i>C. eugenoides</i> (Guabiroba)	<i>C. zeylanicum</i> (Canela)	<i>D. kaki</i> (Caqui)	<i>E. uniflora</i> (Pitanga)	<i>P. rigida</i> (F) <sup>b</sup> (Angico vermelho)	<i>P. rigida</i> (C) <sup>b</sup> (Angico vermelho)	<i>P. americana</i> (Abacate)
<i>S.aureus</i>	12,7 ± 0,6 h	24,6 ± 0,7 b	17,5 ± 0,4 d	nd	14,5 ± 0,7 fg	16,2 ± 0,6 de	19,7 ± 0,3 c	nd
<i>E.faecalis</i>	nd	15,5 ± 0,4 c	14,0 ± 0,4 efg	nd	11,7 ± 0,3 i	13,1 ± 0,5 fgh	14,2 ± 0,6 def	nd
<i>L.monocytogenes</i>	nd	27,6 ± 0,9 b	11,4 ± 0,2 g	nd	24,2 ± 0,6 c	12,0 ± 0,4 g	14,6 ± 0,2 f	nd
<i>L.plantarum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>B.cereus</i>	21,6 ± 0,6 b	18,9 ± 0,5 c	15,6 ± 0,2 ef	nd	17,0 ± 0,0 d	17,2 ± 0,3 d	17,2 ± 0,5 d	10,7 ± 0,3 h
<i>B.subtilis</i>	10,6 ± 0,2 g	16,5 ± 0,7 c	13,2 ± 0,3 ef	nd	19,0 ± 0,4 b	12,5 ± 0,0 f	12,5 ± 0,7 f	nd
<i>Y.enterocolitica</i>	nd	16,6 ± 0,0 d	nd	nd	20,0 ± 0,4 c	17,5 ± 0,9 d	17,0 ± 0,7 d	nd
<i>E.coli</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>S.typhimurium</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>E.aerogenes</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>P.vulgaris</i>	nd	19,5 ± 0,7 c	15,5 ± 0,4 d	nd	18,5 ± 0,4 c	15,4 ± 0,5 d	15,2 ± 0,3 d	nd
<i>P.aeruginosa</i>	nd	nd	11,4 ± 0,5 b	nd	nd	13,0 ± 0,4 a	13,9 ± 0,6 a	nd

<sup>a</sup> Áreas de inibição incluindo o diâmetro do disco de 9mm. Os dados referem-se à média de quatro replicatas ± DP. Graus de inibição: 10 -13,9 mm: fraco; 14-18 mm: moderado; >18 mm: forte.

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes (p<0,05). nd: não detectada. <sup>b</sup> F: folhas; C: casca

**Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos avaliados no teste de difusão em disco <sup>a</sup> (continuação)**

Bactéria	<i>P. edulis</i> (Cammbucá)	<i>P. cattleyanum</i> (Araçá)	<i>P. guajava</i> (Goiaba)	<i>S.</i> <i>terebinthifolius</i> (Aroeira)	<i>S. cumini</i> (Jambolão)	Ampicilina	Cloranfenicol
<i>S.aureus</i>	16,5 ± 0,7 de	16,4 ± 0,2 de	13,6 ± 0,2 fgh	13,4 ± 0,2 gh	15,2 ± 0,3 ef	36,1 ± 0,9 a	26,0 ± 1,3 b
<i>E.faecalis</i>	13,0 ± 0,4 gh	15,2 ± 0,3 cd	14,6 ± 0,5 cde	13,4 ± 0,2 fgh	12,6 ± 0,2 hi	28,1 ± 0,7 a	23,2 ± 0,6 b
<i>L.monocytogenes</i>	12,0 ± 0,4 g	16,5 ± 1,5 ef	17,1 ± 0,6 e	10,7 ± 0,3 g	21,5 ± 0,7 d	33,1 ± 1,2 a	28,4 ± 1,0 b
<i>L.plantarum</i>	nd	nd	nd	nd	nd	32,0 ± 0,9	29,2 ± 1,0
<i>B.cereus</i>	15,7 ± 0,3 ef	15,7 ± 0,3 ef	14,7 ± 0,3 f	15,0 ± 0,4 f	16,2 ± 0,6 de	12,1 ± 0,2 g	27,9 ± 0,7 a
<i>B.subtilis</i>	11,2 ± 0,3 g	15,0 ± 0,7 d	13,7 ± 0,6 e	11,2 ± 0,3 g	12,7 ± 0,5 ef	28,7 ± 0,3 a	29,2 ± 0,6 a
<i>Y.enterocolitica</i>	14,5 ± 0,9 e	nd	nd	nd	12,4 ± 0,5 f	29,7 ± 0,3 b	31,5 ± 0,4 a
<i>E.coli</i>	nd	nd	nd	nd	nd	22,9 ± 0,7	28,5 ± 1,1
<i>S.Typhimurium</i>	nd	nd	nd	nd	nd	27,2 ± 0,5	24,0 ± 0,7
<i>E.aerogenes</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23,5 ± 0,4
<i>P.vulgaris</i>	15,2 ± 0,3 d	11,9 ± 0,2 e	nd	nd	nd	27,2 ± 0,9 a	21,7 ± 1,2 b
<i>P.aeruginosa</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9,0 ± 0,4 c

<sup>a</sup> Áreas de inibição incluindo o diâmetro do disco de 9mm. Os dados referem-se à média de quatro replicatas ± DP. Graus de inibição: 10 -13,9 mm: fraco; 14-18 mm: moderado; >18 mm: forte.

Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes (p<0,05). nd: não detectada. <sup>b</sup> F: folhas; C: casca

O extrato de *A. minus* não apresentou inibição expressiva contra a grande maioria das espécies bacterianas testadas, entretanto, de modo interessante, apresentou forte atividade inibitória contra *B. cereus* (maior zona de inibição contra esta espécie de micro-organismo). O extrato de *P. americana* exibiu apenas uma fraca inibição contra *B. cereus*, não apresentando atividade contra as demais espécies de bactérias, e o extrato de *D. kaki* não apresentou atividade contra nenhuma das espécies testadas.

Conforme mencionado por Burt (2004), a comparação de resultados de atividade antimicrobiana obtidos por diferentes autores é difícil, principalmente em se tratando de produtos naturais. Diversas variações contribuem para esta dificuldade, tais como as metodologias de preparação do inóculo, o método de inoculação, o volume de extrato sendo testado e inclusive o solvente utilizado para a preparação do extrato, dentre outras. Desta forma, os resultados e conclusões devem ser examinados cuidadosamente, considerando o contexto em que estão inseridos.

Souza et al. (2004) realizando um *screening* a fim de avaliar a atividade antimicrobiana de 18 extratos metanólicos de plantas medicinais contra sete espécies de micro-organismos, detectaram atividade do extrato de *P. rigida* contra as quatro espécies de bactérias Gram-positivas testadas: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *Micrococcus luteus*. *E. coli*, a única espécie Gram-negativa avaliada, não foi inibida por este extrato. No mesmo estudo, o extrato de *E. uniflora* apresentou atividade inibitória contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*, enquanto o extrato de *P. cattleyanum* foi ativo contra *S. epidermidis*, *B. subtilis* e *M. luteus*. Em um estudo acerca da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na prevenção e controle da mastite bovina, Avancini et al. (2008) reportaram forte atividade antibacteriana de um extrato aquoso de *P. rigida* contra *S. aureus* e *Salmonella choleraesuis*. De forma semelhante, no presente estudo, esta espécie vegetal resultou em dois dos extratos mais ativos avaliados quanto à inibição de bactérias Gram-negativas.

A atividade antibacteriana de um extrato hidroalcoólico de folhas de *S. cumini* foi reportada contra 17 isolados bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos de importância na saúde animal e humana (Loguercio et al., 2005). Diferentemente do presente estudo, os autores não verificaram diferença de sensibilidade entre micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos.

Conforme mencionado para sua atividade antioxidante, *P. guajava* é uma espécie já estudada quanto às suas atividades biológicas.

Em estudo prévio (CHAH et al., 2006), foi detectada atividade antimicrobiana importante de um extrato metanólico desta planta contra as seguintes espécies Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes, isoladas de fermentos: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* spp. e *Shigella* spp. De modo diferente, no presente estudo, somente espécies Gram-positivas foram inibidas pelo extrato etanólico de *P. guajava*. Linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) também foram inibidas por um extrato etanólico de *P. guajava* (PESEWU; CUTLER; HUMBER, 2008), assim como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. vulgaris*. No mesmo estudo, foi avaliada a atividade antimicrobiana de um extrato etanólico obtido a partir das folhas de *P. americana*, que apresentou atividade contra as espécies Gram-positivas testadas. Também foi reportada atividade antimicrobiana de *P. americana* (extrato metanólico das folhas) contra isolados clínicos de *Moraxella catarhalis* (RASHEED; THAJUDDIN, 2011). No presente estudo, contudo, esta planta não apresentou atividade antimicrobiana, exceto por uma fraca inibição de *B. cereus*.

*C. zeylanicum* é um condimento largamente utilizado, e possui diversas aplicações na indústria farmacêutica e de aromatizantes. Em um estudo prévio (SINGH et al., 2007), a oleoresina obtida da casca desta planta apresentou atividade antifúngica e antibacteriana contra diversas espécies patogênicas Gram-positivas e também Gram-negativas. No presente estudo, o extrato etanólico preparado a partir da casca de *C. zeylanicum* também apresentou atividade contra espécies Gram-positivas e Gram-negativas, sendo considerado um dos seis extratos mais ativos, conforme detectado através do ensaio de difusão em disco.

Melo Júnior et al. (2002), avaliando a atividade antimicrobiana de 17 extratos de plantas medicinais contra micro-organismos isolados de alveolite, apontaram o extrato etanólico de *S. terebinthifolius* como o mais ativo. De um total de nove espécies de bactérias, o extrato inibiu o crescimento das cinco espécies Gram-positivas testadas, porém, de forma semelhante ao presente estudo, não foi capaz de inibir nenhuma das bactérias Gram-negativas avaliadas.

Foi reportada atividade antibacteriana de um extrato metanólico das raízes de *Diospyros kaki* contra *Clostridium difficile*, *C. perfringens* e *E. coli* (JEONG et al., 2009). Apesar de no presente estudo ter sido avaliado um extrato preparado a partir das folhas de *D. kaki*, o mesmo não apresentou atividade contra nenhuma das espécies testadas.

Até onde foi possível verificar, ainda não foram reportados resultados acerca da atividade antimicrobiana de *P. edulis*, *C.*

*eugenioides* e *A. minus*. Assim, o presente estudo também contribui para o conhecimento do potencial antibacteriano destas espécies vegetais.

Diversos mecanismos foram propostos a fim de explicar a atividade antimicrobiana de produtos derivados de plantas. Em um estudo acerca do mecanismo de ação do composto fenólico carvacrol, Ultee, Bennis e Moezelaar (2002), sugerem que o grupamento hidroxila presente na molécula é essencial para a sua atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus*. Os autores propõem que este composto atua como um carreador trans-membrana de cátions monovalentes, trocando o próton da hidroxila por outro cátion, como o  $K^+$ , o que resulta em uma redução no gradiente de pH da célula, causando um colapso na força próton-motriz. Como consequência, não pode mais haver a síntese de ATP, levando à morte celular. Esta capacidade trocadora de íons deve-se à presença do grupamento hidroxila e de um sistema de elétrons deslocalizados (ligações duplas) no anel fenólico do carvacrol.

No presente estudo, os extratos que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos (*P. rigida*, *C. zeylanicum* e *P. edulis*, vide Tabela 2) estiveram entre os que apresentaram a maior atividade antimicrobiana. De forma análoga, os extratos com os teores mais baixos de compostos fenólicos totais (*A. minus*, *P. americana* e *D. kaki*), também tiveram uma fraca ou nenhuma atividade antimicrobiana. Além disso, os coeficientes de correlação entre o grau de inibição de uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) e o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos ( $R = 0,8033$ ;  $0,0009$ ), os resultados do ensaio de DPPH ( $R = -0,84648$ ;  $0,0003$ ) e os resultados do ensaio ABTS ( $R = 0,86226$ ;  $0,0001$ ) foram altamente significantes. O grau de inibição da espécie Gram-negativa *P. vulgaris* também foi bem correlacionado com o conteúdo de fenólicos totais ( $R = 0,64249$ ;  $0,0179$ ) e com os ensaios de captura dos radicais DPPH ( $R = -0,75372$ ;  $0,0029$ ) e ABTS ( $R = 0,77379$ ;  $0,0019$ ). Esses resultados concordam com aqueles reportados por Shan et al. (2007), que afirmam que os compostos fenólicos contribuíram significativamente para a atividade antibacteriana de 46 extratos vegetais metanólicos contra *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella anatum*. Os autores também observaram uma alta correlação entre a atividade antibacteriana e a capacidade antioxidante dos extratos.

Entre os extratos mais ativos avaliados no presente estudo, considerando a atividade antimicrobiana e também antioxidante, a literatura reporta a composição química apenas para as espécies *C. zeylanicum*, *E. uniflora* e *P. edulis*. Na fração acetato etílico de um extrato etanólico de *P. edulis* foram isolados os compostos triterpênicos

$\beta$ -amirina, ácido oleanólico, ácido ursólico e ácido maslínico, identificados através de análise espectrométrica (ISHIKAWA et al., 2008). Os principais compostos identificados em um extrato supercrítico obtido a partir das folhas de *E. uniflora* foram  $C_{15}H_{20}O_2$ , curzereno, 3-hexen-1-ol,  $\beta$ -elemeno e germacreno B (PEIXOTO; OLIVEIRA; CABRAL, 2010). Os compostos fenólicos da casca de *C. zeylanicum* foram identificados como flavan-3-ols tais como a catequina, epicatequina e procianidina B2 (PENG et al, 2008), ácidos fenólicos como o ácido vanílico, ácido cafeico e ácido ferúlico (MUCHUWETI et al., 2007) e terpenóides como o 2-hidroxicinamaldeído e derivados do aldeído cinâmico (SHAN et al., 2005). De acordo com os últimos autores, os compostos hidroxilados desempenharam o papel mais importante na capacidade de captura de radicais livres.

Até o momento, não encontramos publicações acerca da composição química de *P. cattleyanum*, *C. eugenoides* e *P. rigida*.

### 3.5 CMI E CMB

Os extratos mais ativos, de acordo com o ensaio de difusão em disco, tiveram suas CMI e CMB determinadas contra seis espécies bacterianas, sendo três Gram-positivas e três Gram-negativas. Conforme pode ser observado na Tabela 6, os valores de CMI variaram entre 0,075 e 5 mg/mL e os valores de CMB estiveram na faixa de 0,15 a >10 mg/mL.

O extrato de *C. eugenoides* apresentou a maior atividade (menores valores de CMI e CMB) para *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*, apresentando também marcada inibição de *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* e *Y. enterocolitica*. Já os extratos de *P. rigida* (casca) e *P. edulis* apresentaram a maior atividade frente a *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris*.

A resistência de *P. aeruginosa* tem sido reportada para vários antimicrobianos naturais derivados de plantas (BURT, 2004), embora alguns óleos essenciais, geralmente mais ativos que outros extratos, tenham apresentado atividade contra este micro-organismo (CELIK TAS et al., 2007; CAO et al., 2009). No presente estudo, os extratos de *P. rigida* obtidos a partir da casca e também das folhas desta espécie vegetal medicinal apresentaram o maior efeito inibitório e letal observado contra *P. aeruginosa*, dentre os extratos avaliados, com valores de CMI e CMB de 0,075 e 0,62 mg/mL, respectivamente.

**Tabela 6. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos hidroalcoólicos mais ativos contra micro-organismos selecionados de importância em alimentos (mg/mL) <sup>a</sup>**

	<i>C. eugenioides</i> (Guabiroba)		<i>C. zeylanicum</i> (Canela)		<i>E. uniflora</i> (Pitanga)		<i>P. rigida</i> (F) <sup>b</sup> (Angico)		<i>P. rigida</i> (C) <sup>b</sup> (Angico)		<i>P. edulis</i> (Cambucá)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>S.aureus</i>	0,15	0,62	2,5	2,5	0,62	1,25	0,62	2,5	0,62	2,5	0,62	1,25
<i>L.monocytogenes</i>	1,25	2,5	5,0	10,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	5,0	2,5	10,0
<i>B.cereus</i>	0,15	0,15	0,15	0,31	0,31	0,31	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
<i>Y.enterocolitica</i>	0,075	10,0	0,075	2,5	0,075	2,5	0,075	1,25	0,075	0,62	0,075	0,62
<i>P.vulgaris</i>	0,62	5,0	2,5	5,0	1,25	2,5	0,62	1,25	0,62	0,62	0,62	0,62
<i>P.aeruginosa</i>	0,075	2,5	0,075	5,0	0,075	>10,0	0,075	0,62	0,075	0,62	0,62	>10,0

<sup>a</sup> Os testes foram realizados em triplicata e os valores modais são apresentados. <sup>b</sup> F: folha; C: casca.

Em conclusão, os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana demonstram que, dentre os extratos hidroalcoólicos avaliados, os extratos da casca de *P. rigida* e de *C. eugenioides* apresentaram o maior potencial para aplicação como agentes antimicrobianos naturais. O extrato de *C. eugenioides* foi o mais ativo frente às três espécies Gram-positivas testadas na última etapa do trabalho, todas importantes patógenos relacionados a alimentos. Já o extrato proveniente da casca de *P. rigida* apresentou a maior atividade contra as bactérias Gram-negativas avaliadas, em termos de CMI e CMB. Deste modo, uma associação destes dois extratos poderá ser muito interessante, resultando em uma maior efetividade quando da aplicação em alimentos, visando o aumento de sua vida útil e garantia da segurança microbiológica. O extrato da casca de *P. rigida* também apresentou marcada atividade antioxidante, detectada pelos ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS, enquanto o extrato de *C. eugenioides*, além do sequestro dos radicais livres, também apresentou elevada capacidade de complexação com o Ferro<sup>2+</sup>. Assim, a associação destes dois extratos também tende a ser promissora no que concerne à prevenção das alterações oxidativas a que os produtos alimentícios estão sujeitos.

Os resultados obtidos, particularmente aqueles relativos aos extratos de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho) e *Campomanesia eugenioides* (guabiroba), fornecem novas informações a respeito dessas duas espécies nativas do Brasil, e garantem a continuidade dos estudos acerca das atividades biológicas de sub-frações de seus extratos e de sua composição química. Além disso, como não existem publicações sobre a análise fitoquímica destas espécies vegetais, fazem-se necessários estudos para poder-se associar um ou mais composto(s) bioativo(s) com uma determinada atividade biológica apresentada.

#### 4 REFERÊNCIAS

AVANCINI, C. et al. Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control of bovine mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 894-899, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

CAO, L. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, p. 801-805, 2009.

CAROVIC-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, p. 196-201, 2010.

CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent – ferrozine. **Analytical Biochemistry**, v. 40, p. 450–458, 1971.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CHAH, K. F. et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 164-167, 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Tenth Edition**. CLSI document M2-A10 [ISBN 1-56238-688-3]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009b.

DEWANTO, V. et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3010-3014, 2002.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768-1774, 2009.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

ERDEMOGLU, N. et al. Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities on *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. *minus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 318-323, 2009.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571-1578, 2011.

GU, H. et al. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. **Food Research International**, v. 41, p. 208-217, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

ISHIKAWA, T. et al. Evaluation of gastroprotective activity of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (*Myrtaceae*) leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 527-529, 2008.

JEONG, E. et al. Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. roots and its derivatives toward intestinal bacteria. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1006-10100, 2009.

KAHL, R.; KAPPUS, H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, v. 196, p. 329-338, 1993.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, p. 288-306, 2011.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 496–502, 2003.

MARTINEZ-CORREA, H. et al. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 998-1006, 2011.

MELO JÚNIOR, E. J. M. et al. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, v. 9, p. 109-116, 2002.

MUCHUWETI, M. et al. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. **American Journal of Food Technology**, v. 2, p. 414-420, 2007.

NICIFOROVIC, N. et al. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3125-3130, 2010.

OWUSU-APENTEN, R. K. **Introduction to Food Chemistry**. Washington, D.C.: CRC Press, 2005. 249 p.

PEIXOTO, C. A.; OLIVEIRA, A. L.; CABRAL, F. A. Composition of supercritical carbon dioxide extracts of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, p. 848-860, 2010.

PENG, X. et al. Cinnamon bark proanthocyanidins as reactive carbonyl scavengers to prevent the formation of advanced glycation endproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1907-1911, 2008.

PESEWU, G. A.; CUTLER, R. R.; HUMBER, D. P. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 102-111, 2008.

QUIAN, H.; NIHORIMBERE, V. Antioxidant Power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 5, p. 676-683, 2004.

RASHEED, M. U.; THAJUDDIN, N. Effect of medicinal plants on *Moraxella catarhalis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 133-136, 2011.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RUSSEL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 71, p. 191-201, 1991.

SAS Institute Inc. **System for Microsoft Windows**, Release 9.1, Cary, NC, USA (cd-rom), 2002-2003.

SHAN, B. et al. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 112-119, 2007.

SHAN, B. et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7749-7759, 2005.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1650-1661, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SMÂNIA JR. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177–181, 1995.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPHOONPHON, S. Study on antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, v. 103, p. 381-388, 2007.

ULTEE, A.; BENNIK, 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**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

VELÁZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91-97, 2003.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

WANG, W.; BOSTIC, T. R.; GU, L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1193-1198, 2010.

YAMAGUCHI, F. et al. Antioxidant and antiglycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 180-185, 2000.

## **CAPÍTULO 5**

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO (*L. nobilis*) EM LINGUIÇA FRESCAL TOSCANA**



## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO (*L. nobilis*) EM LINGUIÇA FRESCAL TOSCANA

### RESUMO

O presente estudo buscou avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de louro aplicado em linguiça frescal toscana armazenada a 7 °C por 14 dias. Os valores de CMI e CMB foram determinados *in vitro* para 12 espécies de bactérias e a cinética de inativação de *E. coli* e *Y. enterocolitica* em caldo foi avaliada. As linguiças adicionadas do óleo essencial, nas concentrações de 0,05% e 0,1%, não apresentaram diferença significativa nos valores de TBARS, comparativamente ao controle. O pH foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior durante o período de armazenamento, coerentemente à menor contaminação microbiana destas amostras em relação ao controle. As linguiças com adição de óleo essencial apresentaram menores contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos, micro-organismos psicrotróficos, bactérias lácticas e coliformes totais. Nenhuma das amostras apresentou contaminação por coliformes termotolerantes e *S. aureus* nos dias 0 e 14 de estocagem. A adição do óleo essencial de louro à linguiça frescal Toscana pode ser recomendada, uma vez que houve uma redução significativa na contaminação por coliformes totais, chegando a 2,8 ciclos logarítmicos (0,1% de óleo essencial adicionado), além de um aumento de dois dias na vida útil do produto, verificado através da contagem total de micro-organismos psicrotróficos. Estes efeitos foram observados utilizando-se concentrações de óleo essencial inferiores à média das CMI determinadas *in vitro*. O produto foi considerado aceitável sob o ponto de vista sensorial, em ambas as concentrações testadas.

**Palavras-chave:** linguiça frescal, louro, *Laurus nobilis*, óleo essencial, atividade antimicrobiana.

### ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activities of laurel essential oil applied in fresh Tuscan

sausage stored at 7 °C for 14 days. Minimal inhibitory concentration (CMI) and minimal bactericidal concentration (CMB) were determined *in vitro* for 12 species of bacteria and the kinetics of inactivation of *E. coli* and *Y. enterocolitica* in broth was evaluated. The sausages containing laurel essential oil at 0.05% and 0.1% presented similar TBARS values as those of the control sausage. However, their pH was significantly lower ( $p < 0.05$ ) during the storage period, which is consistent with their lower microbial contamination compared with the control sausage. Sausages with laurel essential oil presented lower counts of mesophilic aerobes, psychrotrophs, lactic acid producing bacteria and total coliforms. No contamination with thermo-tolerant coliforms or *S. aureus* was detected on days 0 and 14 of storage in any of the sausage sample. The addition of laurel essential oil to Tuscan fresh sausage significantly reduced total coliform contamination in up to 2.8 log and increased in two days product shelf life, as determined by the total count of psychrotrophic microorganisms. These effects were observed using lower essential oil concentrations than those previously used in *in-vitro* tests. The product was considered acceptable from the sensorial standpoint at both concentrations tested. The overall results indicate a promising application of laurel essential oil in fresh sausages.

**Keywords:** fresh sausage, laurel, *Laurus nobilis*, essential oil, antimicrobial activity.

## 1 INTRODUÇÃO

As linguiças constituem os derivados cárneos fabricados em maior quantidade em nosso país, uma vez que a sua elaboração não exige tecnologia sofisticada, utilizando poucos e baratos equipamentos. Por este motivo, as pequenas agroindústrias geralmente iniciam suas atividades com a fabricação de linguiças. Entretanto, por não serem submetidas a um tratamento térmico, as linguiças frescas, com alta atividade de água, apresentam uma elevada carga microbiana e conseqüentemente uma reduzida vida de prateleira (TERRA, 1998; ORDÓÑEZ, 2005).

O regulamento técnico de identidade e qualidade de linguiças (BRASIL, 2000) define linguiça Toscana como “produto cru e curado obtido exclusivamente de carne suína, adicionada de gordura suína e ingredientes”. Ainda segundo este regulamento, as linguiças frescas

caracterizam-se por apresentar teores máximos de 70% de umidade, 30% de gordura e 0,1% de cálcio (em base seca), e um teor mínimo de 12% de proteína.

Apesar dos embutidos frescos serem considerados produtos geralmente seguros, sendo cozidos antes do consumo, as toxi-infecções alimentares podem ocorrer pelo consumo do produto insuficientemente cozido ou contaminado após o cozimento, risco que pode existir em qualquer produto cárneo (VARNAM; SUTHERLAND, 1998).

Nos últimos anos, a utilização de agentes conservadores naturais em alimentos tem sido amplamente aceita por parte dos consumidores, que cada vez mais procuram por produtos mais naturais e saudáveis, com um menor conteúdo de aditivos sintéticos. Além disso, os consumidores estão familiarizados à presença de ervas e especiarias em diversos alimentos, normalmente adicionados a fim de conferir sabor e aroma. Por este motivo, os óleos essenciais derivados de condimentos podem ser considerados produtos naturais de escolha para fins de conservação de produtos alimentícios (LEMAY et al., 2002; MILITELLO et al., 2011).

O louro (*Laurus nobilis*) é um condimento bastante apreciado em pratos típicos brasileiros tais como a feijoada, da qual as linguiças geralmente fazem parte, e também é utilizado para temperar cortes de carne suína em geral. As folhas desidratadas e também o óleo essencial de louro são utilizados como condimento e flavorizante na culinária e na indústria alimentícia (SANTOYO et al., 2006). A atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* de extratos provenientes de *L. nobilis* tem sido reportada (ERTURK, 2006; SANTOYO et al., 2006; OZCAN et al., 2010). Entretanto, até o momento, não encontramos na literatura dados a respeito da aplicação do óleo essencial de louro em produtos cárneos.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de louro *in vitro* e em linguiça fresca Toscana, buscando a melhoria da qualidade microbiológica do produto, e ainda avaliar a sua possível atividade antioxidante nesta matriz cárnea. Também buscou-se avaliar a aceitabilidade da linguiça adicionada de óleo essencial de louro sob o ponto de vista sensorial.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de louro foi extraído a partir de 5 kg de folhas da planta fresca pelo processo de destilação a vapor, utilizando-se um equipamento em escala-piloto fabricado em aço inoxidável. O processo de destilação foi acompanhado por duas horas. O conteúdo condensado foi reunido e transferido para funil de separação, onde o óleo essencial foi obtido pela separação espontânea das fases. A fase superior foi coletada em tubo de Falcon de 50 mL contendo 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. A amostra foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 5 °C. O óleo obtido como um líquido límpido foi transferido para frasco de vidro âmbar e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

### 2.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

#### 2.2.1 Preparo das soluções para as análises cromatográficas

Em balão volumétrico de 10 mL, 100 µL do óleo essencial foram dissolvidos em diclorometano SupraSolv (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Uma alíquota de 2 mL desta solução de óleo essencial 1% foi transferida para frasco de 2 mL e armazenada sob refrigeração.

#### 2.2.2 Análise por cromatografia gasosa (CG/DIC)

A solução da amostra foi analisada pela injeção de 1 µL em um cromatógrafo CG Varian CP-3800 (Walnut Creek, CA, USA), equipado com injetor split/splitless (razão 1:10), uma coluna capilar Rtx-5MS com 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA), um detector de ionização de chama (FID) e um amostrador automático Varian CP 8410 (Walnut Creek, CA, USA). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 50 °C por 2 minutos, aumento na razão de 2 °C/minuto até 220 °C, onde permaneceu por 3 minutos. Temperatura do injetor: 240 °C. Temperatura do detector: 240 °C. Nitrogênio N-50 (Alphagaz, V. Carioca, SP, BR) foi usado como gás de arraste a 1,2 mL/min. A quantificação foi realizada por normalização de área, sendo que foram considerados somente os picos maiores de 0,15%. As análises foram realizadas em triplicata. As análises foram realizadas

sob as mesmas condições com uma coluna capilar Rtx-WAX de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA).

Para o cálculo dos índices de retenção, injetou-se uma amostra padrão de solução de hidrocarbonetos C7-C30 *Saturated Alkanes Std* (Supelco analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), os quais foram analisados com a mesma programação do equipamento que as amostras. A partir dos resultados dos tempos de retenção das substâncias desta amostra padrão, calculou-se o índice de retenção (IR) de cada substância utilizando-se a fórmula de Van den Dool e Kratz:

$$IR = 100n + \frac{100(T_x - T_n)}{T_{n+1} - T_n}$$

Onde:  $T_n$  e  $T_{n+1}$  são os tempos de retenção dos n-alcenos de referência;  
 $n$  é o número de carbonos do n-alceno de referência;  
 $T_x$  é o tempo de retenção da substância de interesse.

### 2.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

A solução da amostra foi analisada pela injeção de 1 µL em um cromatógrafo CG 2010 SHIMADZU (Tóquio, Japão), equipado com injetor split/splitless (razão 1:10), uma coluna capilar Rtx-5MS 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas CGMS-QP 2010 SHIMADZU (Tóquio, Japão). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: 50 °C por 2 minutos, aumento na razão de 2 °C/minuto até 220 °C, onde permaneceu por 3 minutos. A temperatura do injetor, da fonte de íons e da interface foram de 240 °C, 200 °C e 220 °C, respectivamente. Hélio Ultra Puro (Linde Gás, Jundiaí, SP, BR) foi usado como gás de arraste, a 1,2 mL/minuto. O espectrômetro de massas foi operado no modo *scan*, ionização por impacto eletrônico a 70 eV, com intervalo de varredura na faixa de  $m/z$  35-350 u.m.a., em ciclos de 0,5 s. A identificação dos picos foi feita com o auxílio da biblioteca informatizada de espectros de massas (NIST 05) e sequência de eluição. As análises foram realizadas sob as mesmas condições com uma coluna capilar Rtx-WAX de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura (Restek, EUA).

## 2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO

### 2.3.1 Culturas bacterianas

O óleo essencial foi testado frente a 12 cepas bacterianas, sendo seis cepas Gram-positivas e seis cepas Gram-negativas, a saber: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Listeria monocytogenes* sorotipo 2 ATCC 19112, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. As cepas foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  nos meios de cultura apropriados adicionados de 10% de glicerol, e repicadas para tubos inclinados de ágar triptose de soja (TSA), mantidos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada através do método de microdiluição (CLSI, 2009), com modificações. As culturas em TSA foram repicadas para ágar sangue e incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 12-18h, a fim de verificar-se a morfologia das colônias e a pureza da cultura. A partir destas placas, tomou-se de 3 a 5 colônias isoladas e transferiu-se para caldo triptose de soja (TSB), incubado a  $35^{\circ}\text{C}$  por 2 a 6 horas, a fim de obter-se uma cultura em crescimento ativo. O inóculo foi preparado a partir da cultura ativa de cada espécie bacteriana, diluída em solução salina 0,9% a uma concentração de aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, comparável à solução padrão de McFarland 0,5, verificada espectrofotometricamente a 625nm. A suspensão foi diluída a aproximadamente  $10^7$  UFC/ml, em solução salina, e esta suspensão foi utilizada para inocular os poços das placas de microdiluição.

O óleo essencial foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) à concentração de 100mg/mL. A seguir, foram preparadas diluições sucessivas, na faixa de 10 mg/mL a 0,075 mg/mL, em caldo Mueller-Hinton. Foram adicionados aos poços das placas de microdiluição 100 $\mu\text{L}$  de cada solução diluída e 5  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana. Em cada placa, foram mantidos controles de esterilidade (sem adição de inóculo) e controles de crescimento (caldo Mueller-Hinton adicionado de DMSO

e inóculo). A pureza das suspensões de inóculo foi verificada através da inoculação simultânea em ágar não seletivo. Com exceção de *Y. enterocolitica*, cuja placa foi incubada a 30°C, as placas foram incubadas a 36 °C por 18h e o crescimento microbiano detectado visualmente e confirmado pela adição de 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% (m/v) com incubação adicional de 1 hora, à mesma temperatura. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em mg/mL. A CMI foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu totalmente o crescimento microbiano (SMÂNIA JR. et al., 1995).

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada com base na metodologia proposta por Celiktas et al. (2007), a partir das microplacas utilizadas para a determinação da CMI. De cada poço onde não ocorreu crescimento microbiano visível, foram transferidas alíquotas (10µL) para placas de ágar triptona de soja (TSA). As placas foram incubadas a 36°C por 24h e o crescimento de colônias foi verificado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mg/mL. A CMB foi definida como a menor concentração de cada óleo essencial que impediu totalmente o crescimento microbiano nas placas sem a presença do agente antimicrobiano.

### **2.3.3 Ensaios de cinética de inativação de *E. coli* e *Y. enterocolitica* em caldo**

Os ensaios de cinética de inativação de *E. coli* e *Y. enterocolitica* pelo óleo essencial de louro foram realizados com base na metodologia descrita por Xu et al. (2008). O óleo essencial, solubilizado em DMSO (1:10), foi adicionado em caldo triptose de soja (TSB) nas concentrações finais de 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL (CMI e CMB, respectivamente) para *Y. enterocolitica* e de 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL (CMI = CMB e ½ CMI = ½ CMB, respectivamente) para *E. coli*. Os inóculos foram preparados a partir de culturas *overnight* e ajustados de forma a obter-se uma contagem inicial de aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC/mL. A incubação foi realizada a 37 °C, em banho-maria com agitação, e nos tempos 0 min, 10 min, 20min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h foram retiradas amostras para a realização da contagem de unidades formadoras de colônias, em ágar triptose de soja (TSA) inoculado em profundidade. Os ensaios foram repetidos duas vezes, e os resultados expressos como a média ± desvio padrão para cada tempo de análise.

## 2.4 ELABORAÇÃO DO EMBUTIDO FRESCAL

Os lotes experimentais de linguiça frescal Toscana foram elaborados no setor de processamento de carnes do Instituto Federal Catarinense – Campus Concórdia, de acordo com a formulação industrial apresentada na Tabela 1. Além dos ingredientes utilizados na formulação controle, os tratamentos foram adicionados de óleo essencial de louro, conforme a seguinte descrição:

- T1: adição de 0,05% de óleo essencial de louro
- T2: adição de 0,1% de óleo essencial de louro

Foram preparados 4 kg de massa cárnea para cada lote experimental. A carne e o toucinho foram moídos em moedor elétrico, utilizando-se disco de 8mm de diâmetro. O óleo essencial foi misturado ao sal da formulação, sendo este previamente desidratado em estufa a 105 °C por 24 h e resfriado em dessecador. Os demais ingredientes e aditivos passaram por uma pré-mistura antes de serem manualmente misturados à carne e ao toucinho, em bacias plásticas previamente higienizadas e sanificadas com álcool 70%.

**Tabela 1. Ingredientes utilizados (%) na formulação da linguiça Toscana**

<b>Ingrediente/Aditivo</b>	<b>Controle</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
Carne suína magra (pernil)	77,43	77,43	77,43
Toucinho	12,13	12,13	12,13
Água gelada	7,76	7,76	7,76
Sal (NaCl)	1,18	1,18	1,18
Sal de cura (nitrito e nitrato de sódio)	0,28	0,28	0,28
Estabilizante (polifosfatos)	0,26	0,26	0,26
Fixador de cor (eritorbato de sódio)	0,26	0,26	0,26
Condimento comercial para linguiça Toscana	0,52	0,52	0,52
Açúcar	0,18	0,18	0,18
Óleo essencial de louro	-	0,05	0,1

A massa cárnea resultante foi embutida em tripa natural suína, em embutideira manual, e as linguiças foram acondicionadas em porções de cerca de 200 g (duas unidades), em bandejas de isopor envoltas por filme de policloreto de vinila (PVC), identificadas e armazenadas a 7 °C. Foram realizadas duas repetições para cada tratamento e para o controle, e o experimento foi repetido por duas vezes, em ocasiões diferentes ( $n = 2 \times 2 = 4$ ).

## 2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras naturalmente contaminadas foram submetidas às análises microbiológicas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias, utilizando-se as metodologias preconizadas pela *American Public Health Association* (APHA, 2001). Foram pesadas asepticamente amostras de  $25 \pm 0,2$  g do produto, transferidas para saquetas estéreis e homogeneizadas por um minuto em *stomacher* com 225 mL de água peptonada 0,1%. A partir desta diluição, foram preparadas diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente. A contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e micro-organismos psicrotróficos foi realizada utilizando-se *Plate Count Agar* (PCA), com inoculação em profundidade, após incubação a 36 °C por 48h e a 7 °C por 10 dias, respectivamente. As bactérias lácticas foram enumeradas utilizando-se ágar de Man Rogosa & Sharp (MRS), com inoculação em profundidade e utilizando-se sobrecamada do mesmo meio, após incubação a 36 °C por 72h. O grupo dos coliformes totais foi enumerado através de inoculação do ágar vermelho violeta neutro bile (VRB), por profundidade em com sobrecamada, incubado a 35 °C por 24 h. A enumeração de coliformes termotolerantes foi realizada nos dias 0 e 14, transferindo-se 6 colônias do ágar VRB para tubos de caldo *E. coli* (EC) contendo tubos de Durham, incubados em banho-maria por 24 h a 44,5 °C para posterior verificação da produção de gás. Paralelamente, foram incubados tubos inoculados com *E. coli* e *Enterobacter aerogenes* como controles positivo e negativo, respectivamente. A contagem de *Staphylococcus aureus* também foi realizada nos dias 0 e 14, através de inoculação em superfície do ágar Baird-Parker suplementado com gema de ovo e telurito de potássio. Após incubação a 36 °C por 48 h, as colônias típicas e atípicas foram contadas separadamente e seis colônias de cada tipo foram transferidas para tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI), incubados a 36 °C por 24 h. A partir destas culturas, foi realizado o teste de coagulase, utilizando-se plasma de

coelho liofilizado. Paralelamente, foi realizado o teste de coagulase com uma cultura padrão de *S. aureus*.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS REAGENTES AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A avaliação da rancidez das linguças foi realizada nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias, através do método do ácido tiobarbitúrico (TBA), com modificações (RAHARJO et al.,1992). Resumidamente, foram pesados 5 g da amostra previamente moída e homogeneizada, aos quais foram adicionados 18 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (TCA), 0,5 mL de solução alcoólica de butilhidroxitolueno (BHT) e 2,0 mL de sulfanilamida a 0,5%. A mistura foi agitada durante um minuto em vortex e mantida por 10 minutos em repouso. A seguir, foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado para balão volumétrico de 25 mL, cujo volume foi completado com TCA. Desta solução foram transferidos 2,0 mL para tubos de ensaio, aos quais foi adicionado igual volume de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,08 M. Os tubos foram mantidos por 30 minutos em banho-maria a 80 °C e resfriados por 10 minutos em banho de água fria. A leitura da absorbância foi realizada a 531 nm e o fator de conversão de 7,8 foi utilizado para o cálculo dos valores de TBARS (YILDIZ-TURP et al., 2010). Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído por kg de amostra. As análises foram realizadas em duplicata.

## 2.7 DETERMINAÇÃO DO PH

O pH das amostras foi verificado em cada dia de amostragem, de acordo com Terra e Brum (1988), utilizando-se um pHmetro (Hanna Instruments, HI 253). Foram pesados 10 g de amostra, homogeneizados com 100 mL de água destilada, e as medições de pH foram realizadas após cinco minutos, em triplicata.

## 2.8 ANÁLISE SENSORIAL

Para a realização da análise sensorial, foram elaborados novos lotes de linguça frescal Toscana, adicionados de óleo essencial de louro, nas concentrações de 0,1% e 0,05%. A avaliação sensorial das linguças, previamente assadas por 35 minutos a 280-300 °C, foi realizada por 50

juízes não treinados, consumidores habituais do produto, através de teste de escala hedônica (MEILGAARD et al., 2007). Os parâmetros avaliados foram: aparência, odor, firmeza, sabor e aceitabilidade global, utilizando-se uma escala estruturada de sete pontos, em que 1 equivalia a “gostei muitíssimo” e 7 a “desgostei muitíssimo” (Anexo A). A realização da análise sensorial foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina (Apêndice A).

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos em todas as análises do embutido fresco foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para cada dia de análise, com nível de significância de  $p < 0,05$ . As diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Segundo Oussalah et al. (2007), a composição dos óleos essenciais é altamente influenciada por diversos fatores, como genótipo da espécie vegetal, sazonalidade e condições geográficas e climáticas. Portanto, o óleo essencial isolado foi caracterizado por cromatografia gasosa (CG/DIC e CG/EM) e os dados qualitativos e quantitativos estão apresentados na Tabela 2.

A partir das análises cromatográficas, foi possível identificar 26 compostos, que representaram 91,92% da composição do óleo volátil. Os monoterpenos oxigenados constituíram a fração predominante e totalizaram 63,93% da composição. Os compostos majoritários foram 1,8-cineol (35,50%) e linalol (14,10%), seguidos em menores proporções pelo sabineno (9,45%) e o éster acetato de terpinila (9,65%), em concordância com resultados previamente publicados para esta espécie vegetal (CAREDDA et al., 2002; FLAMINI et al., 2007; DILEO LIRA et al., 2009).

**Tabela 2. Composição química do óleo essencial de louro, determinada por CG-FID e CG-MS**

<b>Composto<sup>a</sup></b>	<b>IRE<sup>b</sup></b>	<b>%</b>
$\alpha$ -Tujeno	923	0,35
$\alpha$ -Pineno	929	3,07
Sabineno	970	9,45
$\beta$ -Pineno	972	2,81
$\beta$ -Mirceno	990	1,21
$\delta$ -3-Careno	1009	0,36
$\delta$ -4-Careno	1014	0,24
(+)-Silvestreno	1026	1,52
1,8-Cineol	1028	35,50
( <i>E</i> )- $\beta$ -Ocimeno	1047	0,33
$\gamma$ -Terpineno	1056	0,55
<i>cis</i> -Sabineno hidratado	1067	0,30
$\alpha$ -Terpinoleno	1086	0,22
$\beta$ -Terpineol	1099	0,29
Linalol	1102	14,10
Terpinen-4-ol	1176	0,93
$\alpha$ -Terpineol	1191	2,78
Nerol	1231	0,18
Acetato de $\alpha$ -terpinila	1349	9,65
Acetato de nerila	1367	0,20
$\beta$ -Elemeno	1389	1,10
$\beta$ -Cariofileno	1413	2,69
$\alpha$ -Guaieno	1435	0,25
$\alpha$ -Humuleno	1447	0,74
Germacreno D	1476	0,56
$\alpha$ -Farneseno	1499	2,54
Monoterpenos hidrocarbonados		20,11
Monoterpenos oxigenados		63,93
Sesquiterpenos hidrocarbonados		7,88
Total identificado (%)		91,92
Rendimento em óleo essencial (% m/m de material fresco)		0,19

<sup>a</sup>Os compostos estão listados em ordem de eluição da coluna Rtx-5MS; <sup>b</sup> Índice de retenção determinado experimentalmente na coluna Rtx-5MS, utilizando-se uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub>

### 3.2 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Conforme pode ser observado na Tabela 3, os valores de CMI determinados para o óleo essencial de louro variaram de 1,25 a 10 mg/mL e os valores de CMB apresentaram-se entre 2,5 e >10 mg/mL.

**Tabela 3. Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial de louro (mg/mL)<sup>a</sup>**

<b>Espécie bacteriana</b>	<b>CMI</b>	<b>CMB</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	10	>10,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10	10,0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	5,0	10,0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	2,5	10
<i>L. monocytogenes</i> sorotipo 2 ATCC 19112	1,25	5,0
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	5,0	5,0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,5	2,5
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	5,0	10,0
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	2,5	5,0
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	2,5	5,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10,0	>10,0
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	1,25	2,5

<sup>a</sup> Os testes foram realizados em triplicata e os resultados referem-se aos valores modais

Dentre as espécies de micro-organismos testadas, as mais suscetíveis à ação inibitória e letal do óleo essencial de louro foram *Y. enterocolitica*, *L. monocytogenes* sorotipo 2, *E. coli*, *S. Enteritidis* e *S. sonnei*. É interessante observar que destas cinco espécies bacterianas, quatro são Gram-negativas, grupo reportado por vários autores como mais resistente à ação dos agentes antimicrobianos, incluindo os óleos essenciais (CHORIANOPOULOS et al.,

2004; CAO et al., 2009), em comparação às espécies Gram-positivas. Desta forma, a detecção de atividade antibacteriana de um determinado óleo essencial contra bactérias Gram-negativas deve ser valorizada, uma vez que muitas destas espécies estão relacionadas a

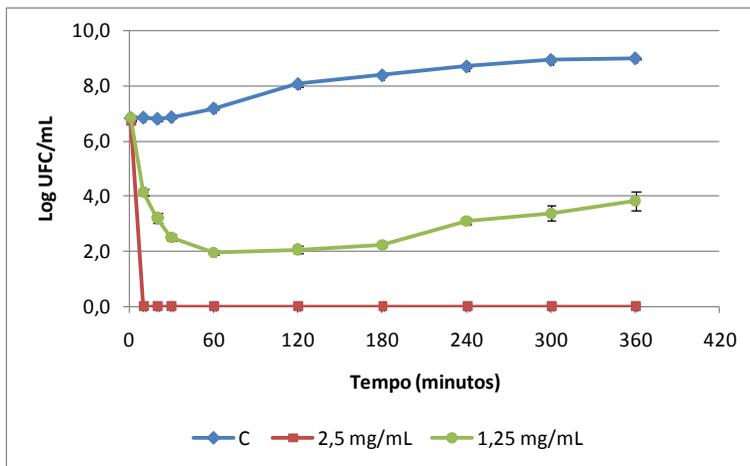
toxi-infecções alimentares e à deterioração de alimentos, notadamente da carne e produtos cárneos (JAY, 2005).

Os resultados do presente estudo são da mesma ordem de magnitude daqueles reportados por Ozcan et al. (2010) para a atividade antimicrobiana (CMI) de um óleo essencial de louro, o qual apresentou, por exemplo, valores de CMI de 3,0, 1,0 e 4,0 mg/mL para *S. aureus* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. coli* ATCC 25922, respectivamente. Erturk (2006) determinou valores de CMI iguais a 5,0 mg/mL para *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* ATCC 10145, para um extrato supercrítico desta planta.

### 3.3 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DE *E. coli* E *Y. enterocolitica* EM CALDO

A Figura 1 representa a cinética de inativação de *E. coli* pelo óleo essencial de louro, acompanhada por um período de seis horas. É possível observar que, na presença de 2,5 mg/mL de óleo essencial (CMI = CMB), o inóculo inicial, de 6,83 log UFC/mL, foi reduzido para <1 log UFC/mL já nos primeiros dez minutos de incubação, o que comprova o efeito bactericida do óleo essencial de louro nesta concentração e demonstra sua rápida atividade contra a bactéria testada.

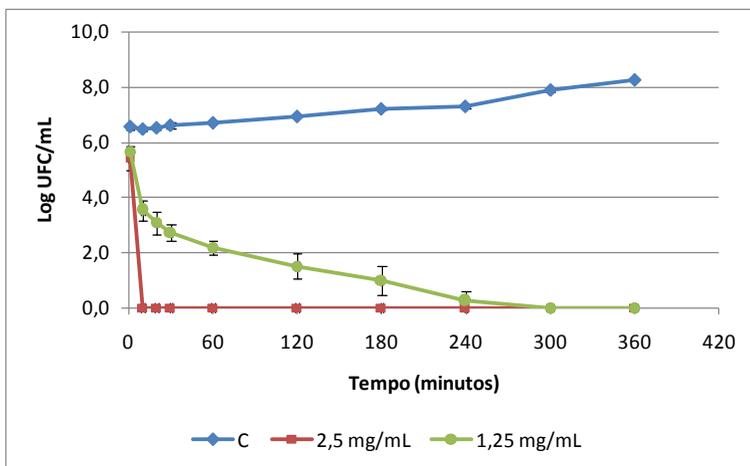
Também foi testada uma concentração de óleo essencial de louro equivalente à metade da CMI/CMB (1,25 mg/mL). Nesta concentração, o inóculo inicial (6,84 log UFC/mL) sofreu uma redução gradual na primeira hora de incubação, atingindo um mínimo de 1,96 log UFC/mL aos 60 minutos, o que equivale a uma redução de aproximadamente 4,9 ciclos logarítmicos. Após um período de adaptação ao meio (fase lag), que pode ser visualizado graficamente dos 60 aos 120 minutos de incubação, as células remanescentes voltaram a reproduzir-se, atingindo uma densidade média de 3,90 log UFC/mL após seis horas de incubação. Ao final deste período, a cultura controle (sem adição de óleo essencial) apresentava uma população média de 8,98 log UFC/mL.



**Figura 1. Cinética de inativação de *E. coli* pelo óleo essencial de louro. C: controle; CMI=CMB: óleo essencial adicionado na concentração mínima inibitória e bactericida (2,5 mg/mL);  $\frac{1}{2}$  CMI= $\frac{1}{2}$  CMB: óleo essencial adicionado em 50% da concentração mínima inibitória e bactericida (1,25 mg/mL)**

Gachkar et al. (2007), avaliando a cinética de inativação de *E. coli* ATCC 25922 pelos óleos essenciais de cominho e alecrim, verificaram que a aplicação dos referidos óleos nas concentrações equivalentes à CMB (1,0 e 2,0 mg/mL) resultou na efetiva eliminação deste micro-organismo (inoculado na concentração inicial de  $10^7$  UFC/mL) após 20 e 25 minutos, respectivamente. Em outro estudo (FU et al., 2009), os óleos essenciais de cravo e alecrim, testados nas concentrações iguais à CMB (1,25 e 5,0 mg/mL), promoveram a eliminação de *E. coli* ATCC 8739 após 8 e 12 horas de incubação, respectivamente. Ao testarem concentrações inferiores à CMB de ambos os óleos essenciais, após uma redução inicial a população bacteriana voltou a crescer, comportamento também observado no presente trabalho. Silva et al. (2009) avaliaram a cinética de inativação de uma linhagem de *E. coli* isolada de caso clínico pelos óleos essenciais de gengibre, hortelã pimenta, alecrim, canela, cravo da índia e capim-cidreira. Destes óleos, os dois últimos foram os mais ativos, promovendo a completa inativação da cultura após 3 horas de incubação.

A cinética de inativação de *Y. enterocolitica* pelo óleo essencial de louro está representada na Figura 2. A cultura controle apresentou uma população inicial média de 6,55 log UFC/mL, que sofreu uma elevação gradativa ao longo do período de incubação, atingindo ao final de seis horas um nível de 8,25 log UFC/mL.



**Figura 2. Cinética de inativação de *Y. enterocolitica* pelo óleo essencial de louro. C: controle; CMB: óleo essencial adicionado na concentração mínima bactericida (2,5 mg/mL); CMI: óleo essencial adicionado na concentração mínima inibitória (1,25 mg/mL)**

Na presença de uma concentração de óleo essencial equivalente à CMB (2,5 mg/mL), observou-se que a contagem inicial de células foi cerca de um ciclo logarítmico inferior (5,52 log UFC/mL) ao controle, possivelmente devido a uma redução na população microbiana causada já ao primeiro contato do inóculo com o meio contendo o óleo essencial. Analogamente ao comportamento apresentado por *E. coli*, observou-se uma redução drástica (<1 log UFC/mL) na população de *Y. enterocolitica* já nos primeiros dez minutos de incubação, demonstrando o efeito bactericida do óleo essencial de louro também contra este micro-organismo. Testando-se uma concentração menor de óleo essencial, equivalente à CMI (1,25 mg/mL), também observou-se uma contagem inicial inferior (5,65 log UFC/mL) ao controle, que foi gradualmente reduzida até <1 log UFC/mL após cinco horas de

incubação. Azeredo et al. (2011) avaliaram a cinética de inativação de *Y. enterocolitica* ATCC 9610 pelos óleos essenciais de orégano e alecrim em caldo à base de vegetais, incubado a 37 °C. As concentrações utilizadas foram equivalentes à CMI (2,5 µL/mL para o óleo essencial de orégano e 20 µL/mL para o óleo essencial de alecrim). O óleo essencial de alecrim reduziu o inóculo inicial (cerca de  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL) para aproximadamente  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL após 4 horas de incubação, enquanto o óleo de orégano promoveu o mesmo grau de inativação já no tempo zero. Entretanto, não foi observada nenhuma redução adicional na população microbiana até o período final de 24 horas.

*Y. enterocolitica* é considerada um micro-organismo único dentre os patógenos alimentares devido à capacidade de tornar-se psicrotrófico. Além disso, é capaz de resistir ao congelamento, e também produz uma enterotoxina termoestável resistente ao aquecimento a 100 °C por 20 minutos (JAY, 2005). A habilidade de crescer em temperaturas de refrigeração representa uma vantagem sobre outros micro-organismos eventualmente presentes no alimento, o que pode fazer com que esta bactéria venha a ser o agente causador de toxi-infecções alimentares (GRAHEK-OGDEN et al., 2007).

A infecção por *Y. enterocolitica* é considerada a 3ª maior causa de gastroenterite aguda após a salmonelose e a campylobacteriose (GRAHEK-OGDEN et al., 2007; MESSELHÄUSER et al., 2011). Trata-se de um micro-organismo comensal do suíno (DAVIES, 2011), e acredita-se amplamente que este animal constitua a fonte mais comum de *Y. enterocolitica* responsável por infecções em humanos (JAY, 2005; DAVIDSON et al., 2011). Níveis de contaminação já detectados em carne suína e produtos derivados foram suficientemente elevados (entre  $10^3$  e  $10^5$  UFC/g) para representar risco à saúde do consumidor, não apenas pelo consumo de produtos de carne suína mal passados como também através da contaminação cruzada na produção ou no preparo de alimentos (MESSELHÄUSER et al., 2011).

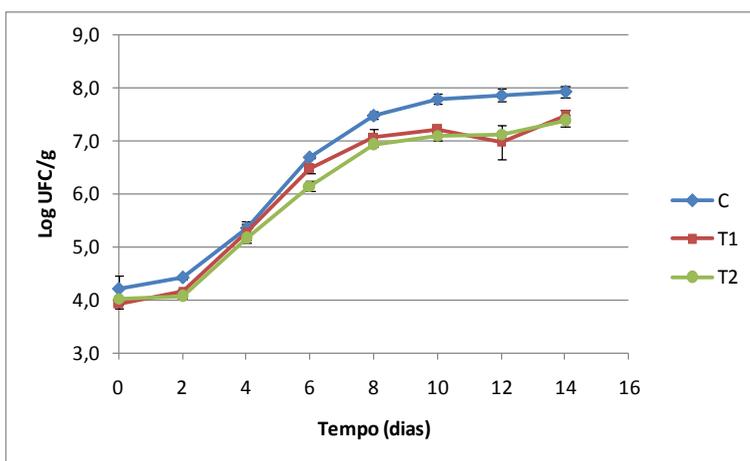
### 3.4 APLICAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LOURO EM LINGUIÇA FRESCAL TOSCANA

#### 3.4.1 Análises microbiológicas

As contagens microbianas ao longo do período de armazenamento da linguiça fresca Toscana sob refrigeração estão

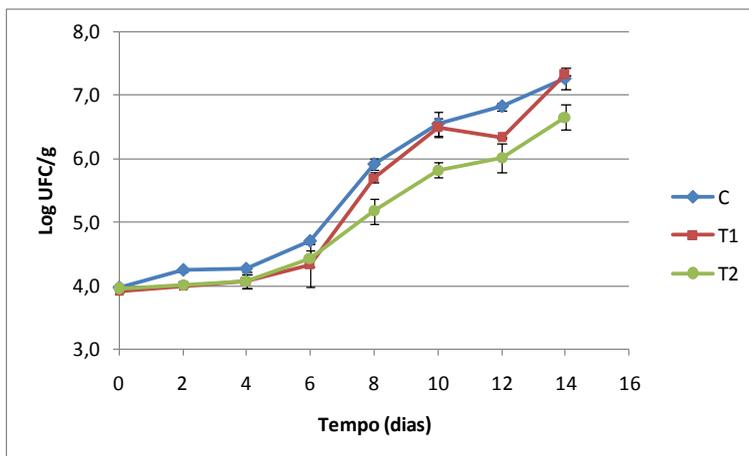
apresentadas nas Figuras 3 a 6. As contagens de todos os grupos de micro-organismos avaliados foram significativamente ( $p < 0,05$ ) afetadas pela adição do óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05 e 0,1%.

A contagem inicial de micro-organismos psicrotróficos (Figura 3) nas amostras foi de aproximadamente 4 log UFC/g. Com exceção dos dias 0 e 4, a contagem deste grupo de bactérias foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior nas amostras adicionadas de óleo essencial, comparativamente ao controle. A contagem deste grupo de micro-organismos excedeu o valor de 7 log UFC/g, considerado como limite para avaliação de vida útil (GEORGANTELIS et al., 2007; GIATRAKOU; NTZIMANI; SAVVAIDIS, 2010), no dia 8 (controle e T1) e no dia 10 (T2). Assim, houve um acréscimo de dois dias na vida de prateleira do produto adicionado de 0,1% de óleo essencial (T2) em relação ao controle. Uma extensão de vida útil dessa ordem está de acordo com um estudo realizado por Giatrakou et al. (2010), que, avaliando a adição de óleo essencial de tomilho (0,2%) em um produto à base de carne de frango fresca, reportaram um aumento de dois dias na vida de prateleira do produto, determinada microbiologicamente através da contagem total de micro-organismos mesófilos.



**Figura 3.** Contagem de micro-organismos psicrotróficos nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C.

No presente trabalho, com relação à contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (Figura 4), a contaminação inicial das amostras também foi de cerca de 4 log UFC/g. Nos dias 2, 8, 10 e 12 de armazenamento, a contagem deste grupo de micro-organismos nas linguiças adicionadas de óleo essencial de louro na concentração de 0,1% (T2) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) inferior às amostras controle.



**Figura 4.** Contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C.

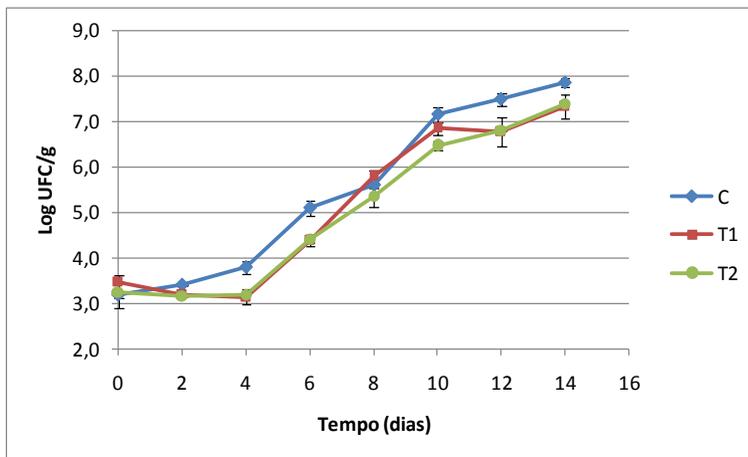
A contagem excedeu 7 log UFC/g no último dia de armazenamento (dia 14) das amostras controle e T1, enquanto a contagem das amostras T2 foi de 6,65 log UFC/g, também demonstrando um acréscimo na vida de prateleira do produto. Convém considerar, entretanto, que por tratar-se de um produto fresco, o mesmo deve ser armazenado sob refrigeração, e desta forma o grupo de micro-organismos psicrótróficos seria um indicador mais adequado da vida útil do produto.

Chouliara et al. (2007), avaliando o efeito da adição de óleo essencial de orégano (0,1%) à carne de frango, observaram que a contagem total de micro-organismos mesófilos atingiu 7 log UFC/g no dia 5-6 para a amostra controle, e no dia 6-7 para a carne adicionada de

óleo essencial, o que representa um pequeno aumento na vida de prateleira do produto. Já quando a vida útil foi avaliada sensorialmente, as amostras contendo óleo essencial (0,1%) tiveram um aumento de 3-4 dias em relação ao controle. As amostras com adição de óleo essencial de orégano também apresentaram menores contagens de bactérias lácticas e de enterobactérias. Em outro estudo, Viuda-Martos et al. (2010c) avaliaram o efeito da adição de fibra de laranja e óleo essencial de orégano em mortadela, e verificaram uma redução na contaminação do produto adicionado de fibra e de óleo essencial, comparativamente ao controle. Ao final do período de armazenamento de 24 dias, a amostra controle atingiu uma contagem total de mesófilos de 6 log UFC/g, ao passo que o produto contendo o aditivo natural ainda não havia atingido este nível de contaminação. A contagem de bactérias lácticas também foi inferior ao controle, durante todo o período de estocagem.

As bactérias lácticas constituem um grupo de micro-organismos que podem desenvolver-se em produtos cárneos frescos contendo nitrito, armazenados sob refrigeração (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). A presença do nitrito confere proteção contra o *Clostridium botulinum*, mas é ineficaz contra bactérias lácticas e enterobactérias. Assim, a microbiota de linguiças frescas será geralmente dominada por enterobactérias, *Pseudomonas*, enterococos, micrococos, leveduras e bactérias lácticas, que irão ocasionar a sua deterioração (BROMBERG, 2002).

O grupo das bactérias lácticas tomou parte da microbiota inicial das linguiças (Figura 5), tanto nas amostras controle como naquelas adicionadas de óleo essencial. A contagem inicial foi de cerca de 3,2 a 3,5 log UFC/g, aumentando progressivamente até atingir contagens superiores a 7 log UFC/g ao final do período de 14 dias de armazenamento a 7 °C. Do dia 2 ao dia 6, ambas as amostras adicionadas de óleo essencial apresentaram contagens de bactérias lácticas significativamente ( $p < 0,05$ ) inferiores ao controle. No 10º dia de armazenamento, a amostra T2 foi significativamente menos contaminada por bactérias lácticas, comparativamente ao controle. Embora não estatisticamente significativa, as amostras adicionadas de óleo essencial de louro mantiveram menores contagens (0,5 a 0,7 ciclo logarítmico) até o final do período de armazenamento.

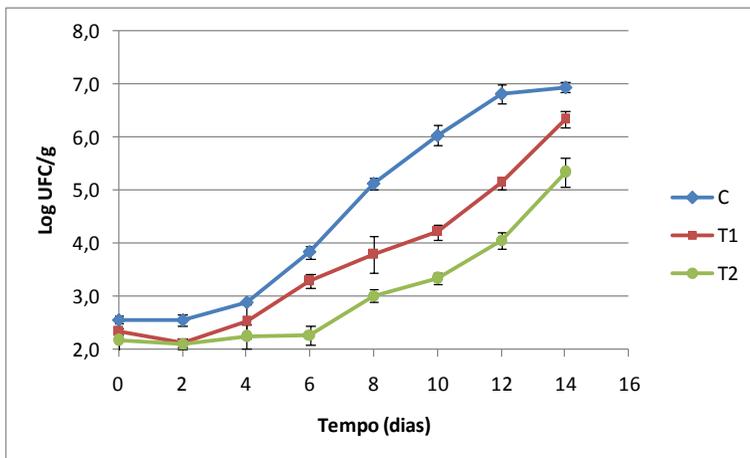


**Figura 5.** Contagem de bactérias lácticas nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C.

A presença do óleo essencial de louro reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a contaminação das linguiças frescas por coliformes totais (Figura 6) no dia 2 e do 6º dia até o final dos 14 dias de estocagem do produto, em relação ao controle. Nas linguiças adicionadas de 0,1% de óleo essencial, a redução de coliformes totais chegou a 2,8 ciclos logarítmicos, no 12º dia de armazenamento.

O grupo dos coliformes compreende espécies de bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbios e anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com formação de ácido e gás quando incubados a 35 °C. Constituem um importante grupo indicador da qualidade dos alimentos, sendo que altas contagens podem indicar contaminação pós-processamento, limpeza e sanitização deficientes, tratamento térmico ineficiente ou crescimento durante o processamento ou estocagem (FRANCO E LANDGRAF, 2005; JAY, 2005).

A significativa inibição do grupo coliforme nas linguiças adicionadas de óleo essencial de louro foi coerente com os resultados obtidos nos ensaios realizados *in vitro* (item 3.2), em que este óleo essencial apresentou atividade bacteriostática e bactericida contra diversas espécies de bactérias Gram-negativas, notadamente contra *E. coli* (que integra o grupo coliforme) e *Y. enterocolitica*.



**Figura 6. Contagem de coliformes totais nas linguiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C.**

A inibição de coliformes em produtos cárneos adicionados de óleos essenciais tem sido observada por outros autores. Hac-Szymanczuk et al. (2011) verificaram que o óleo essencial de alecrim (1,0%) aplicado em uma massa à base de carne suína e água armazenada a 4 – 6 °C por 7 dias foi capaz de reduzir a contaminação do produto por este grupo de micro-organismos. Por outro lado, no mesmo estudo, a contaminação da massa cárnea adicionada de folhas de alecrim (5%) foi superior ao controle, em que nenhum agente antimicrobiano foi adicionado. Analisando o próprio condimento, os autores comprovaram sua contaminação por coliformes e também por bolores e leveduras. Isto demonstra a utilidade, em muitos casos, da aplicação de óleos essenciais em substituição aos condimentos *in natura*.

Com relação à contaminação das linguiças por coliformes termotolerantes e por *S. aureus*, não foi detectada a presença destes micro-organismos nos dias em que estas análises foram realizadas (dias 0 e 14, dados não apresentados), sendo os resultados expressos como <10 UFC/g e <100 UFC/g, respectivamente.

A efetividade dos óleos essenciais, quando aplicados em alimentos visando à atividade antimicrobiana, geralmente é reduzida em função da presença de lipídios, proteínas e outros ingredientes aos quais os componentes do óleo essencial podem permanecer ligados, restando

apenas uma proporção na forma livre para exercer atividade antimicrobiana (MEJHOLM; DALGAARD, 2002; TASSOU; NICHAS; SKANDAMIS, 2004). Segundo esses autores, devido ao seu caráter lipofílico, o óleo essencial dissolve-se na fase oleosa do alimento, tornando-se menos disponível para atuar sobre as bactérias presentes na fase aquosa. Além disso, as matrizes alimentícias podem atuar como barreiras que protegem as células bacterianas do efeito dos agentes antimicrobianos presentes, e a disponibilidade de nutrientes, maior do que a encontrada nos meios de cultura, leva a uma recuperação mais rápida dos micro-organismos que eventualmente tenham sofrido dano celular.

A estrutura física do alimento também pode influenciar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais. Buscando avaliar a atividade do óleo essencial de orégano contra *S. Typhimurium* em meio líquido (caldo) e em um gel de gelatina de mesma composição em nutrientes, Skandamis et al. (2000) observaram que a matriz de gelatina reduziu drasticamente a atividade antimicrobiana do óleo essencial, possivelmente devido à menor difusão das gotículas de óleo, que medem em torno de 10 a 18  $\mu\text{m}$  (BROCKLEHURST et al., 1995), nesta matriz. Os autores apontam que a difusão destas partículas pode ser afetada pela densidade, viscosidade e tortuosidade do meio em que se encontram.

O crescimento de bactérias em meios líquidos se dá de forma planctônica, diferentemente do que ocorre em uma matriz sólida, onde formam-se colônias na superfície ou em seu interior. Além disso, a distribuição espacial dos micro-organismos nos alimentos não é homogênea. Assim, a ecologia microbiana de um alimento específico, sua capacidade tamponante, pH local, disponibilidade de oxigênio e acumulação de metabólitos também são fatores que interferem na atividade dos agentes antimicrobianos (TASSOU; NICHAS; SKANDAMIS, 2004). Por estes motivos, geralmente são necessárias concentrações de 10 a 100 vezes maiores de óleo essencial para que se obtenham, nos alimentos, os mesmos efeitos observados *in vitro* (BURT, 2004).

No presente estudo, verificamos que a aplicação do óleo essencial de louro em linguíça frescal Toscana, mesmo em concentrações inferiores à maioria das CMI e CMB determinadas *in vitro*, resultou em um efeito positivo no controle do desenvolvimento microbiano no produto.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. De modo geral, entende-se que a inibição do crescimento microbiano pelos óleos essenciais seja

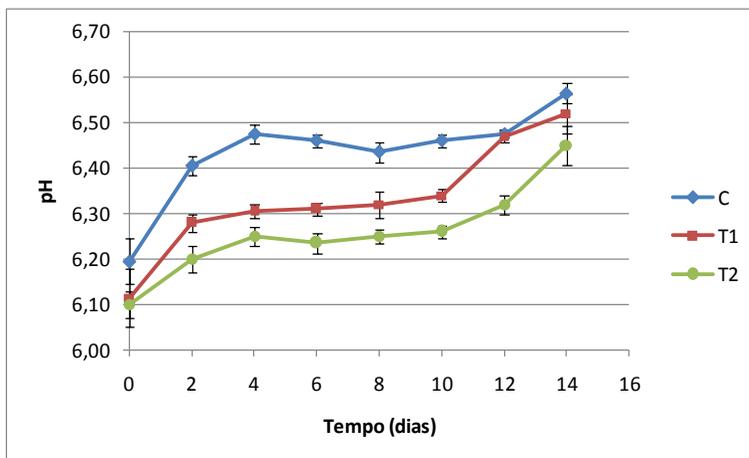
devida ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos (SHYLAJA; PETER, 2004). Cox et al. (2001) avaliaram o mecanismo de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, constituído na sua maior parte por monoterpenos cíclicos, sobre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os autores constataram que os efeitos inibitórios do óleo essencial são consistentes com a partição dos constituintes monoterpênicos na membrana celular, e que o dano causado à membrana produz diferentes efeitos em diferentes micro-organismos. Oyedemi et al. (2009) reportam ainda a perda de conteúdo celular, como lípidios e proteínas, como efeitos de alguns componentes de óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O principal componente identificado no óleo essencial de louro foi o 1,8-cineol (35,5%), seguido pelo linalol (14,1%). De fato, ambos os compostos demonstraram ser ativos quando testado contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conforme reportado por Sokovic et al. (2008). Carson et al. (2002), testando a atividade do 1,8-cineol sobre *S. aureus*, constataram que este composto promoveu a perda de conteúdo citoplasmático, aumento da suscetibilidade das células ao cloreto de sódio e ainda perda de material 260 nm absorvente, sugerindo ter havido perda de ácidos nucleicos através da membrana celular previamente danificada.

### **3.4.2 Avaliação da rancidez oxidativa e do pH**

As modificações nos valores de pH das amostras durante os 14 dias de armazenamento a 7 °C estão representadas na Figura 7.

O pH inicial das linguças foi de 6,1 e 6,2 nas amostras adicionadas de óleo essencial e nas amostras controle, respectivamente, e sofreu uma elevação no decorrer do período de armazenamento, atingindo um valor médio de 6,6 no controle e de 6,4 – 6,5 nas demais amostras, ao final de 14 dias. Com exceção do primeiro e último dia de armazenamento, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras avaliadas, sendo o pH do controle superior ao das linguças adicionadas de óleo essencial.



**Figura 7.** Evolução do pH das linguças frescas controle e formuladas com óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C.

A tendência de elevação do pH observada nas linguças frescas pode ser relacionada ao aumento da população microbiana ao longo do período de armazenamento. Ao satisfazer seus requerimentos de nutrição e sobrevivência, os micro-organismos causam diversas alterações na carne (LAWRIE, 2005), sendo o aumento do pH uma delas. Uma vez esgotado o suprimento de carboidratos simples, espécies de *Pseudomonas*, juntamente com psicrotróficos Gram-negativos tais como *Moraxella*, *Algaligenes*, *Aeromonas* e *Serratia*, utilizam aminoácidos livres e compostos nitrogenados simples como fonte de energia, com produção de amônia, levando à elevação do pH do meio (JAY, 2005). É importante destacar que o filme de policloreto de vinila – PVC, utilizado para embalar os produtos, apresenta elevada permeabilidade ao oxigênio, em torno de 6000 a 8000 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h, em condições padrão de temperatura e pressão (HAYES et al., 2010), permitindo o desenvolvimento de micro-organismos aeróbios, tais como *Pseudomonas*. De acordo com Hayes (1993), o pH pode ser utilizado como indicativo do estado de conservação da carne. Quanto mais o pH se eleva, maior o estado de deterioração da mesma.

Os valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), expressos em mg de malonaldeído (MDA) por kg de amostra estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Valores de TBARS (mg MDA/kg)<sup>a</sup> das lingüiças frescas controle e adicionadas de óleo essencial de louro nas concentrações de 0,05% (T1) e 0,1% (T2) durante o período de armazenamento a 7 °C<sup>b</sup>**

Dias	Controle	T1	T2
0	0,16 ± 0,00 a	0,13 ± 0,04 a	0,13 ± 0,01 a
2	0,20 ± 0,05 a	0,26 ± 0,04 a	0,23 ± 0,01 a
4	0,16 ± 0,00 a	0,20 ± 0,05 a	0,17 ± 0,01 a
6	0,21 ± 0,03 a	0,17 ± 0,01 a	0,20 ± 0,01 a
8	0,25 ± 0,00 a	0,14 ± 0,01 a	0,18 ± 0,06 a
10	0,19 ± 0,00 a	0,17 ± 0,01 b	0,16 ± 0,00 b
12	0,15 ± 0,04 a	0,12 ± 0,00 a	0,12 ± 0,02 a
14	0,13 ± 0,01 a	0,05 ± 0,00 a	0,12 ± 0,04 a

<sup>a</sup> mg de malonaldeído por kg de amostra; <sup>b</sup> Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não são significativamente diferentes (p<0,05)

Durante todo o período de armazenamento, os índices de TBARS de todas as amostras mantiveram-se abaixo de 0,5 mg/kg, índice apontado como o limiar a partir do qual os consumidores são capazes detectar rancidez (SHEARD et al., 2000), não caracterizando desta forma um estado de oxidação aparente das mesmas. A causa para este fato provavelmente deve-se a uma combinação de fatores, tais como a utilização, na formulação, de nitrito de sódio e eritorbato de sódio, aditivos típicos do produto e que apresentam atividade antioxidante (PRICE; SCHWEIGERT, 1994; HONIKEL, 2008). Além disso, o emprego de uma pequena proporção (12%) de gordura possivelmente tenha reduzido a susceptibilidade do produto à oxidação lipídica.

Mesmo apresentando baixos índices de TBARS, é possível observar um aumento nesses valores nos primeiros 4 – 8 dias de armazenamento das amostras, seguido por uma redução gradual até o final do período de estocagem. Este comportamento pode ser atribuído à principal limitação do método do TBA, que reside no fato de que o malonaldeído e outros produtos carbonados de cadeia curta provenientes da oxidação lipídica não são estáveis por um longo período de tempo, devido a sua oxidação, liberando ácidos e alcoóis orgânicos que não são determinados pelo método do TBA (ALMANDOS et al., 1986; FERNÁNDEZ et al., 1997). Outra possibilidade é a utilização do MDA por enterobactérias e *Pseudomonas*, micro-organismos capazes de

metabolizar compostos carbonílicos (SMITH; ALFORD, 1968, apud GEORGANTELIS et al., 2007).

Chouliara et al. (2007) também observaram este padrão (elevação inicial dos índices de TBARS e posterior redução) em carne de frango adicionada de óleo essencial de orégano e também nas amostras sem adição do óleo essencial, atribuindo o fato à possível decomposição do MDA durante o armazenamento do produto. De forma semelhante, Liu et al. (2009) registraram um aumento nos valores de TBARS nos primeiros três dias de armazenamento a 7 °C de linguiça frescal de frango, seguido por uma redução gradual destes índices até o final do período de armazenamento, de 14 dias. Esse comportamento foi observado tanto para as amostras controle como para aquelas adicionadas de alecrim e mogno chinês em pó, nas concentrações de 500, 1000 e 1500 ppm (relativos ao teor de compostos fenólicos totais). Os valores de TBARS determinados no referido trabalho foram superiores aos do presente estudo, variando de cerca de 1,0 até aproximadamente 1,5 mg MDA/kg, o que pode ser explicado pela não utilização de nitritos/nitratos e ascorbatos/eritorbatos na formulação das linguiças.

Os valores de TBARS observados no presente trabalho são semelhantes aos reportados por Georgantelis et al. (2007) para linguiças frescas à base de carne suína adicionadas de antioxidantes naturais (extrato de alecrim e sua combinação com quitosana). No referido trabalho, as amostras controle (sem adição dos extratos) sofreram uma elevação gradual dos valores de TBARS, de cerca de 0,1 mg/kg até 1,2 mg/kg após 20 dias de armazenamento a 4 °C, entretanto, diferentemente do presente trabalho, não foram utilizados nitritos nem ascorbatos/eritorbatos na elaboração das linguiças.

### 3.5 ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados obtidos na análise sensorial das linguiças adicionadas de óleo essencial de louro estão apresentados na Tabela 5. A análise de variância demonstrou que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras em nenhum dos atributos avaliados. As médias para aparência, odor e firmeza situaram-se entre gostei ligeiramente e gostei muito, para ambas as amostras. Com relação ao sabor, ambas as amostras situaram-se entre o ponto considerado neutro (não gostei nem desgostei) e gostei ligeiramente, e considerando a aceitabilidade global, a linguiça adicionada de 0,05% de óleo essencial

apresentou uma nota superior àquela adicionada de 0,1%, porém não estatisticamente significativa.

Os resultados obtidos sugerem que a adição do óleo essencial de louro, nas concentrações de 0,05% e 0,1%, é aceitável pelos consumidores, uma vez que as médias obtidas foram superiores a 4,0. Possivelmente, ajustes na formulação do embutido frescal, no sentido de reduzir a concentração de condimentos adicionados, poderão auxiliar na obtenção de uma formulação mais equilibrada do ponto de vista sensorial, com maior aceitação (maiores escores) e manutenção da atividade antimicrobiana desejada.

**Tabela 5. Média dos escores obtidos na avaliação sensorial das linguças adicionadas de óleo essencial <sup>a,b</sup>**

Atributo	Concentração de óleo essencial (%)	
	0,05	0,1
Aparência	5,8 a	5,6 a
Odor	5,3 a	5,4 a
Firmeza	5,9 a	5,7 a
Sabor	4,7 a	4,5 a
Aceitabilidade global	5,3 a	4,9 a

<sup>a</sup> Avaliação realizada através de escala hedônica de 7 pontos; 4 = não gostei nem desgostei, 5 = gostei ligeiramente, 6 = gostei muito. <sup>b</sup> Médias seguidas pela mesma letra em uma mesma linha não são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Outros estudos também têm demonstrado que a adição de óleos essenciais em produtos cárneos pode ser viável do ponto de vista sensorial. Busatta et al. (2008), verificaram que a aplicação de óleo essencial de manjerona em linguça frescal em um nível de 0,11% resultou em um produto com aceitabilidade equivalente ao mesmo produto sem a adição do referido óleo. A adição de óleo essencial de orégano (0,1%) à carne de frango resultou em um odor desejável ao produto, segundo um painel de julgadores treinados (CHOULIARA et al., 2007). Em experimentos realizados com mortadelas, a adição de óleos essenciais de orégano, alecrim e tomilho, na concentração de 0,02% sobre a massa cárnea, não resultou em efeitos negativos sobre a avaliação sensorial dos produtos, que obtiveram escores semelhantes ou até superiores às amostras sem adição de óleo essencial (VIUDA-

MARTOS et al., 2009; VIUDA-MARTOS et al., 2010a; VIUDA-MARTOS et al., 2010b; VIUDA-MARTOS et al., 2010c).

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a aplicação do óleo essencial de louro em embutidos frescos, nas concentrações de 0,05% e 0,1% pode representar uma barreira adicional ao crescimento microbiano neste tipo de produto, levando ao aumento da vida útil do mesmo, além da redução da contaminação por microorganismos do grupo coliforme, refletindo uma maior qualidade microbiológica deste embutido fresco. Os produtos naturais tais como o condimento avaliado no presente trabalho são amplamente utilizados na preparação de alimentos, sendo classificados como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), e sua adição ao embutido fresco foi considerada aceitável sob o ponto de vista sensorial.

#### 4 REFERÊNCIAS

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. Washington, D.C.: APHA, 2001. 676 p.

ALMANDOS, M. E. et al. Formaldehyde as an interference of the 2-thiobarbituric acid test. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 37, n. 1, p. 54-58, 1986.

AZEREDO, G. A. et al. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541-1548, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: Brasília, 05 abr. 2000, seção I, p. 6-10.

BROCKLEHURST, T. F. et al. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II-Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 609-615, 1995.

BROMBERG, R. Microbiologia de Produtos Embutidos. In: LEMOS, A.L.S.C.; YAMADA, E.A. **Princípios do Processamento de Embutidos Carneos**. Campinas : CTC/ITAL, 2002. 164 p.

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

BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207-211, 2008.

CAO, L. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v. 115, p. 801-805, 2009.

CAREDDA, A. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of *Laurus nobilis* essential oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 1492-1496, 2002.

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**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CHORIANOPOULOS, N. et al. Essential Oils of Satureja, Origanum, and Thymus Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CHOULIARA, E. et al. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4°C. **Food Microbiology**, v. 24, p. 607-617, 2007.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard – Eighth Edition**. CLSI document M7-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, PA 19087 USA, 2009.

COX, S. D. et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. **Molecules**, v. 6, p. 87-91, 2001.

DAVIDSON, V. J. et al. Food-specific attribution of selected gastrointestinal illnesses: estimates from a Canadian expert elicitation survey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 9, p. 983-995, 2011.

DAVIES, P. R. Intensive swine production and pork safety. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 2, p. 189-201, 2011.

DI LEO LIRA, P. et al. Essential oils and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 259-264, 2009.

ERTURK, O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. **Biologia**, v. 61, p. 275-278, 2006.

FERNÁNDEZ, J. PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 345-353, 1997.

FLAMINI, G. et al. Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, p. 36-40, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo : Editora Atheneu, 2005. 182 p.

FU, Y. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 989-994, 2007.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 898-904, 2007.

GEORGANTELIS, D. et al. Effect of Rosemary extracts, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. **Meat Science**, v. 76, p. 172-181, 2007.

GIATRAKOU, V.; NTZIMANI, A.; SAVVAIDIS, I. N. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. **Food Microbiology**, v. 27, p. 132-136, 2010.

GRAHEK-OGDEN, D. et al. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 754-756, 2007.

HAC-SZYMANCZUK, E.; LIPINSKA, E.; STASIUK, M. The effect of rosemary preparations on the microbiological quality and TBARS value of model pork batters. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 10, n. 2, p. 165-174, 2011.

HAYES, P. R. **Microbiologia e Higiene de los Alimentos**. Zaragoza : Acribia, 1993, 369 p.

HAYES, J. E. et al. Evaluation of the effects of selected phytochemicals on quality indices and sensorial properties of raw and cooked pork stored in different packaging systems. **Meat Science**, v. 85, p. 289-296, 2010.

HONIKEL, K. The use and controle of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, p. 68-76, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª Ed. Tradução de Eduardo Cesar Tondo [et al.]. Porto Alegre : Artmed, 2005, 711 p.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**, 6ª ed. Tradução de Jane Maria Rubensam. Porto Alegre : Artmed, 2005, 384 p.

LEMAY, M. et al. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 217 – 226, 2002.

LIU, D. et al. Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 117, p. 106-113, 2009.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**, 4<sup>th</sup> edition. Boca Raton: CRC Press Inc, FL, 2007. 387 p.

MEJHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effects of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 27–31, 2002.

MESSELHÄUSSER, U. et al. Qualitative and quantitative detection of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* in different food matrices at retail level in Bavaria. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n. 1, p. 39-44, 2011.

MILITELLO, M. et al. Chemical composition and antibacterial potential of *Artemisia arborescens* L. essential oil. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1274-1281, 2011.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de alimentos – Alimentos de origen animal**. v. 2. Porto Alegre : Artmed, 2005, 279 p.

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

OYEDEMI, S. O. et al. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n.7, p. 1280-1286, 2009.

OZCAN, B. et al. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. **Journal of Environment Biology**, v. 31, n. 5, p. 637-641, 2010.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. Zaragoza : Acribia, 1994, 581 p.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHMIDT, G. R. Improved speed, specificity and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2182-2185, 1992.

SANTOYO, S. et al. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis* L. Chemical and functional characterization. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 565-571, 2006.

SHEARD, P. R. et al. Shelf life and quality of pork products with raised n-3 PUFA. **Meat Science**, v. 55, p. 213-221, 2000.

SHYLAJA. M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: **Handbook of herbs and spices**. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 360 p.

SILVA, M. T. N. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. J. E. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 31-35, 2000.

SMÂNIA JR., A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 177-181, 1995.

SOKOVIC, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. **Food**, v. 1, n. 2, p. 220-226, 2008.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, E.; SKANDAMIS, P. N. Herbs and spices and antimicrobials. In: **Handbook of herbs and spices**. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 360 p.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1998, 216 p.

TERRA, N. N.; BRUM, M.A. R. **Carne e seus derivados: Técnicas de controle de qualidade**. São Paulo : Nobel, 1988, 119 p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos carnicos - Tecnologia, Química y Microbiología**. Zaragoza : Acribia, 1998, 423 p.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristics of a bologna sausage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 655-660, 2009.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of *mortadella*. **Meat Science**, v. 85, p. 568-576, 2010a.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of adding citrus fibre washing water and rosemary essential oil on the quality characteristics of a bologna sausage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 958-963, 2010b.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Effect of Orange dietary fibre, oregano essential oil and packaging conditions on shelf-life of bologna sausages. **Food Control**, v. 21, p. 436-443, 2010c.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174-179, 2008.

YILDIZ-TURP, G.; SERDAROGLU, M. Effects of using plum puree on some properties of low fat beef patties. **Meat Science**, v. 86, p. 896-900, 2010.



## CONCLUSÃO GERAL

Estudos da composição química dos óleos essenciais de alecrim, folha de canela, capim-limão, funcho, folha de laranja, louro, manjerição, menta, orégano e poejo mostraram que os compostos majoritários presentes nos óleos essenciais com maior atividade antimicrobiana foram os monoterpenos oxigenados: linalol, 1,8-cineol, neral e geranial.

Os óleos essenciais que apresentaram maior atividade antimicrobiana e espectro de ação foram: capim-limão, manjerição, orégano e louro.

A intensidade da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais variou conforme o micro-organismo testado. Dentre os óleos essenciais estudados, o capim-limão apresentou maior atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial de manjerição apresentou maior atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus plantarum* e *Yersinia enterocolitica*. *Enterobacter aerogenes* foi inibido na mesma intensidade pelos óleos de capim-limão e manjerição. A maior atividade antimicrobiana contra *Proteus vulgaris* foi exercida pelo óleo essencial de menta e contra *Bacillus subtilis*, pelo óleo essencial de laranja.

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela, eucalipto e lavanda, o óleo essencial de citronela apresentou a maior atividade contra as bactérias Gram-positivas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*), enquanto o óleo essencial de lavanda evidenciou a maior atividade contra as espécies Gram-negativas *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterobacter aerogenes* e *Proteus vulgaris*. Já o óleo essencial de eucalipto destacou-se por apresentar atividade bacteriostática e bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Dentre os extratos hidroalcoólicos avaliados, aqueles provenientes da guabiroba e da casca de angico vermelho apresentaram o maior potencial para aplicação como agentes antimicrobianos naturais em alimentos.

Considerando-se a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida, o extrato de guabiroba foi o mais ativo frente às espécies Gram-positivas testadas (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*), enquanto o extrato da casca de angico-vermelho apresentou a maior atividade contra as bactérias Gram-negativas avaliadas (*Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa*).

A associação dos extratos de guabiroba e de angico-vermelho poderá resultar em uma maior efetividade quando da aplicação em alimentos, visando o aumento de sua vida útil e garantia da segurança microbiológica.

Os extratos da casca de angico-vermelho, cambucá, canela, pitanga, guabiroba e araçá apresentaram, em ordem decrescente, as maiores capacidades de captura de radicais livres, enquanto a maior capacidade de complexação com o  $\text{Fe}^{2+}$  foi evidenciada nos extratos de guabiroba, araçá, goiaba e cambucá.

A associação dos extratos de guabiroba e da casca de angico-vermelho também tende a ser promissora no que concerne à prevenção das alterações oxidativas a que os alimentos estão sujeitos.

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi correlacionado à capacidade de captura de radicais livres, sugerindo-se que este grupo de compostos seja o principal responsável pela atividade antioxidante apresentada pelos extratos.

O óleo essencial de louro apresentou atividade antimicrobiana *in vitro*, principalmente contra *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*.

A inativação destas duas espécies de micro-organismos, em meio de cultura, ocorreu nos primeiros dez minutos de incubação, quando aplicadas concentrações equivalentes à concentração mínima bactericida.

A aplicação do óleo essencial de louro na concentração de 0,1% em linguiça fresca Toscana levou a um aumento de dois dias na vida útil do produto.

A adição de 0,05% e 0,1% do óleo essencial de louro causou uma redução da contaminação por micro-organismos do grupo coliforme, refletindo uma maior qualidade microbiológica deste embutido frescal.

O produto adicionado do óleo essencial de louro em ambas as concentrações testadas não sofreu rancificação e foi considerado aceitável sob o ponto de vista sensorial.

A aplicação de óleos essenciais em alimentos visando à atividade antimicrobiana mostrou ser viável, entretanto, devido aos diferentes perfis de atividade antimicrobiana apresentados pelos diversos óleos essenciais, a seleção do produto a ser utilizado deve ser realizada levando-se em consideração os patógenos e/ou a microbiota deteriorante associada ao alimento de interesse. A compatibilidade sensorial entre o óleo essencial selecionado e o alimento em questão também deve ser considerada.



**ANEXO**  
**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

## **CERTIFICADO** Nº 1045

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

**APROVADO**

**PROCESSO:** 1045

**FR:** 374781

**TÍTULO:** Aplicação de Extratos Vegetais e Óleos Essenciais como Antimicrobianos e Antioxidantes Naturais em Alimentos

**AUTOR:** Cleide Rosama Werneck Vieira, Sheila Mello da Silveira

**FLORIANÓPOLIS,** 25 de Outubro de 2010.



## **APÊNDICE**

### **FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL**



Ficha de avaliação sensorial

Por favor, avalie cada uma das amostras codificadas e responda às questões de acordo com a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou de cada atributo do produto. Obs.: este não é um teste comparativo. **Avalie cada amostra separadamente.**

- 7 – Gostei muitíssimo
- 6 – Gostei muito
- 5 – Gostei ligeiramente
- 4 - Não gostei nem desgostei
- 3 – Desgostei ligeiramente
- 2 – Desgostei muito
- 1 – Desgostei muitíssimo

Atributo	Amostra	Amostra
Aparência		
Odor		
Firmeza		
Sabor		
Aceitabilidade global		

Comentários:

---



---