

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Elaine Sá Menezes Cutrim

**Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) frente às bactérias patogênicas**

SÃO LUÍS  
2017

Elaine Sá Menezes Cutrim

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) frente às bactérias patogênicas

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek

SÃO LUÍS  
2017

Sá Menezes Cutrim, Elaine.

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) frente às bactérias patogênicas / Elaine Sá Menezes Cutrim. - 2016.

69 f.

Orientadora: Adenilde Nascimento Mouchrek.

Monografia (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

1. Alecrim. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Capacidade antioxidante. 4. Gengibre. 5. Óleos essenciais. I. Nascimento Mouchrek, Adenilde. II. Título.

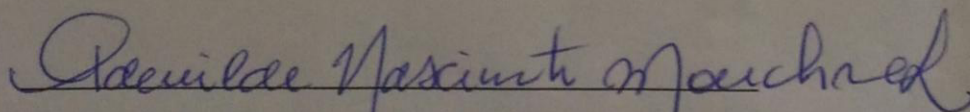
Elaine Sá Menezes Cutrim

Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) frente às bactérias patogênicas

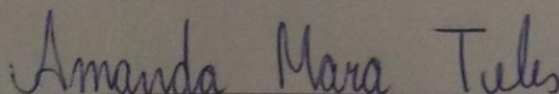
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado à Universidade Federal do Maranhão como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Aprovado em: 30 de 04 de 2017

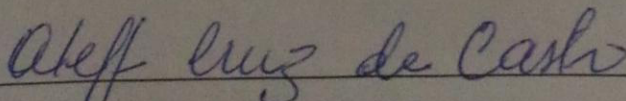
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Adenilde Nascimento Mouchrek – Orientadora  
Universidade Federal do Maranhão



Msc. Amanda Mara Teles  
Universidade Federal do Maranhão



Msc. Aleff Cruz de Castro  
Universidade Federal do Maranhão

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que é o alicerce da minha vida e significado primeiro de família. O momento que vivo hoje é maravilhoso e só existe por sua causa e de todos os sacrifícios silenciosos que você fez para que eu alcançasse meus sonhos. Amo você eternamente.

À minha orientadora, Adenilde Nascimento Mouchrek por possibilitar o início da minha vida científica, pelos ensinamentos diários de dedicação, comprometimento, e, principalmente amor à profissão.

À Amanda Mara Teles, por todo o conhecimento transmitido e experiências trocadas durante esses anos, pelo apoio, incentivo, compreensão e paciência.

Aos amigos que fiz e com os quais dividi as melhores experiências e “bads” da minha vida, Lucas Martins, Wemerson Daniel, Pedro Igor, Marcelo Luiz, Manoel Araújo e Maria Gessica. Vocês sempre farão parte da minha vida.

À turma 2013.1 de Química Industrial, por todo o companheirismo e carinho, pelos momentos de descontração e vinhos baratos compartilhados.

Ao PCQA, por ter sido o berço da minha vida na pesquisa e por todas as companhias de laboratório que tive durante esses anos.

À Universidade Federal do Maranhão, por ter propiciado o desenvolvimento da minha vida acadêmica. Sou muito grata a todas as oportunidades que esta instituição me proporcionou.

A todos os docentes que diferentes formas contribuíram para a minha formação profissional e como ser humano.

À FAPEMA, pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que, de forma direta ou indireta, fizeram parte desta etapa da minha vida, obrigada.

*“Onde quer que as massas forem, vá para o outro lado”.*

Charles Bukowski

## RESUMO

As plantas condimentares e de uso medicinal são utilizadas pelo homem desde a Antiguidade devido as suas propriedades terapêuticas. A partir destas plantas obtêm-se os óleos essenciais, cujas atividades antimicrobiana e antioxidante são comprovadas. Estas propriedades têm ganhado destaque nas últimas décadas devido ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado e a toxicidade apresentada pelos antioxidantes sintéticos. Diante deste cenário, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana e capacidade antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação usando um equipamento tipo Clevenger por um período de quatro horas, sendo obtidos cerca 0,6 mL de cada óleo essencial. A partir da CG/EM identificou-se 17 constituintes no óleo essencial de alecrim, sendo a cânfora (37,00%) e o 1,8-cineol (11,32%) os compostos majoritários. No óleo essencial de gengibre, foram identificados 18 constituintes, sendo  $\alpha$ -zingibereno (27,14%), geranial (14,06%) e nerolidol (13,51%) os compostos majoritários. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi determinada por meio do teste de difusão em ágar, utilizando-se o óleo puro, e Concentração Inibitória Mínima, nas concentrações de 2000 a 75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nos testes foram utilizadas duas cepas microbianas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Os halos de inibição obtidos tiveram diâmetro próximo, em torno de 10 mm, e valores de CIM na faixa de 200 a 1700  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , destacando-se a ação inibitória do óleo essencial de gengibre frente *S. aureus*. A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada pela capacidade de estabilizar o radical livre ABTS nas concentrações de 5 a 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os óleos essenciais de gengibre e alecrim conseguiram inibir 12,41% e 15,8% dos radicais na máxima concentração testada, e apresentaram  $\text{CE}_{50\%}$  de 308,16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 153,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Ambos os óleos essenciais foram considerados ativos. Estas análises visaram determinar a real contribuição dos óleos essenciais do gengibre e do alecrim como antimicrobianos e antioxidantes naturais.

**Palavras-chave:** alecrim; gengibre; óleos essenciais; atividade antimicrobiana; capacidade antioxidante.

## ABSTRACT

Condiment and medicinal plants have been used by man since antiquity because of its therapeutic properties. From these plants are obtained the essential oils, whose antimicrobial and antioxidant activities are proven. These properties have gained prominence in recent decades due to increased bacterial resistance to the antibiotics available on the market and the toxicity of synthetic antioxidants. In view of this scenario, the objective of this research was to evaluate the antibacterial activity and antioxidant capacity of the essential oils of zingiber officinale and Rosmarinus officinalis. The essential oils were obtained by hydrodistillation using Clevenger-type equipment for a period of four hours, obtaining 0.6 ml of each essential oil. The chemical compositions were determined by GC / MS and the major compounds of ginger essential oil were  $\alpha$ -zingiberene (27.14%), geranial (14.06%) and nerolidol (13.51%) whereas rosemary were Camphor (37.00%) and 1,8-cineole (11.32%). The antimicrobial activity of the essential oils was determined by means of the agar diffusion test and Minimum Inhibitory Concentration. Two microbial strains were used in the tests: Escherichia coli (ATCC 25922) and Staphylococcus aureus (ATCC 25923). The inhibitory halos obtained had a proximal diameter of about 10 mm, while the essential oil of ginger presented a very expressive MIC value for S. aureus. The antioxidant capacity was evaluated by the ABTS system in the concentrations of 5 to 30  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The essential oils of ginger and rosemary were able to inhibit 25.9% and 25.7%, and presented  $\text{EC}_{50\%}$  of 128.9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 128.0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . These analyzes aimed to determine the real contribution of the essential oils of ginger and rosemary as antimicrobials and natural antioxidants.

**Keywords:** rosemary; ginger; essential oils; antimicrobial activity; antioxidant capacity.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butil- hidroxí-anisol
BHI	Infusão de cérebro e coração
BHT	Butil-hidroxí-tolueno
CE <sub>50%</sub>	Concentração eficiente ou concentração onde ocorre 50% de inibição
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsufóxido
GP	Galato de propila
I%	Porcentagem de inibição do radical livre ABTS
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
TBHQ	<i>Terc</i> -butil-hidroxí-quinona
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais rotas do metabolismo secundário.....	18
Figura 2 – Locais e mecanismos de ação esquemáticos dos óleos essenciais na célula.....	22
Figura 3 – <i>Escherichia coli</i> .....	23
Figura 4 – Colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
Figura 5 - Mecanismo de ação para antioxidantes primários, onde ROO•, RO• e R• - radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A• – radical inerte.....	26
Figura 6 – Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos BHA, TBHQ BHT e GP.....	27
Figura 7 – Estruturas químicas do antioxidante natural tocoferol (A), tocotrienol (B) e carotenoide (β-caroteno).....	28
Figura 8 - Estabilização do radical ABTS •+ por um antioxidante.....	30
Figura 9 - Parte aérea de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	32
Figura 10 - Moléculas de 1,8-cineol (A), cânfora (B) e α-terpineol (C) presentes no óleo essencial de alecrim.....	33
Figura 11 - Rizomas do gengibre.....	34
Figura 12 - Moléculas de γ-curcumeno (A), neral (B), geranial (C), α-zingibereno (D) e β-felandreno (E) presentes no óleo essencial de gengibre.....	35
Figura 13 - Representação do método de difusão em disco com óleo essencial.....	38
Figura 14 - Representação esquemática da CIM de um óleo essencial pelo método de diluição em meio líquido.....	39
Figura 15 – Cromatograma do óleo essencial do gengibre.....	43
Figura 16 – Cromatograma do óleo essencial do alecrim.....	45
Figura 17 – Gráfico da concentração do óleo essencial de gengibre versus absorvância do radical ABTS.....	53
Figura 18 - Gráfico da concentração do óleo essencial de gengibre versus % de inibição do radical.....	52
Figura 19 - Gráfico da concentração do óleo essencial de alecrim versus absorvância do radical ABTS.....	53
Figura 20 - Gráfico da concentração do óleo essencial de alecrim versus % de inibição do radical ABTS.....	54
Figura 21 – Captura do radical livre ABTS pelos óleos essenciais de alecrim e gengibre.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação.....	41
Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de gengibre.....	44
Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de alecrim.....	46
Tabela 4 - Halo de inibição dos óleos essenciais de <i>Z. officinale</i> e <i>R. officinalis</i> frente aos microorganismos <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .....	47
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de <i>R. officinalis</i> e <i>Z. officinale</i> para os microorganismos <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .....	49
Tabela 6 - Classificação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .....	50

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	133
2 OBJETIVOS.....	155
2.1 Objetivo geral .....	155
2.2 Objetivos específicos .....	155
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	166
3.1 Compostos bioativos em matrizes vegetais .....	16
3.1.1 Metabólitos secundários .....	17
3.1.1.1 Óleos essenciais.....	18
3.2 Antimicrobianos.....	20
3.2.1 Resistência bacteriana .....	20
3.2.2 Antimicrobianos naturais .....	21
3.3 Bactérias patogênicas.....	22
3.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	23
3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
3.4 Antioxidantes .....	25
3.4.1 Antioxidantes sintéticos .....	27
3.4.2 Antioxidantes naturais .....	28
3.4.3 Medidas da capacidade antioxidante.....	29
3.4.3.1 Método ABTS.....	30
3.5 Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.) .....	31
3.6 Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> Roscoe) .....	33
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS .....	36
4.1 Material vegetal .....	36
4.2 Obtenção dos óleos essenciais .....	36
4.3 Análises da composição química dos óleos essenciais .....	36
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana.....	37
4.4.1 Microorganismos testados.....	37
4.4.2 Preparo do inóculo bacteriano.....	37
4.4.3 Difusão em Ágar .....	38
4.4.4 Concentração Inibitória mínima (CIM).....	38
4.5 Avaliação da capacidade antioxidante .....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41

5.1 Rendimento dos óleos essenciais .....	41
5.2 Composição química dos óleos essenciais.....	42
5.3 Atividade antibacteriana .....	47
5.4 Atividade antioxidante .....	52
6 CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são os principais contribuintes do número expressivo de substâncias orgânicas na natureza. As plantas possuem enorme potencial de biossintetizarem os mais variados tipos de estruturas moleculares que desempenham diversas funções em seu organismo. As substâncias responsáveis por garantirem o desenvolvimento e manutenção das células, são denominados de metabólitos primários. A partir desses compostos, por meio de rotas biosintéticas bastante complexas, as plantas produzem os metabólitos secundários, que auxiliam na defesa e adaptação das plantas ao meio ambiente.

Dentre os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, destacam-se os óleos essenciais que são caracterizados por serem uma mistura complexa de constituintes lipossolúveis de baixo peso molecular com forte aroma e normalmente líquidos. Os óleos essenciais destacam-se por sua grande importância terapêutica e econômica, ocupando um lugar preponderante nas indústrias farmacêuticas, cosmética e agroalimentícias devido sua elevada atividade biológica (ANDRADE, 2010).

Apesar das plantas serem utilizadas desde a Antiguidade com fins condimentares e medicinais, somente nas últimas décadas pesquisas vêm se intensificando para aplicação destes compostos na conservação de alimentos e no controle de enfermidades de origem microbiana. Atualmente, os compostos utilizados pela indústria para garantir maior tempo de vida útil aos alimentos são os antioxidantes sintéticos que apesar de serem muito estáveis, apresentam a possibilidade de causarem efeitos indesejáveis em enzimas de vários órgãos humanos, inflamações e formação de tumores (BAUER et al., 2001; TIVERON, 2010).

Além desse cenário, tem-se o grave problema de resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado que ocorre devido a ampla distribuição de antimicrobianos, facilitando o acesso ao consumo pela população, levando a utilização indiscriminada e a automedicação. A dúvida do diagnóstico, a ausência de um programa de uso racional de antimicrobianos e o desconhecimento da prescrição de antimicrobianos quanto as doses, também são fatores que contribuem para o aumento da prevalência de microorganismos resistentes aos medicamentos, tornando os antibióticos ineficazes (MOTA et al., 2010).

Levando em consideração a resistência dos microorganismos às drogas disponíveis, a toxicidade apresentada pelos antioxidantes sintéticos e, tendo em vista a crescente conscientização dos consumidores em relação à utilização de produtos ecologicamente seguros e benéficos para saúde, o uso dos óleos essenciais surge como uma alternativa em

potencial para a substituição dos compostos sintéticos como agentes antimicrobianos e antioxidantes.

Uma das maiores fontes de pesquisa nessa área é a avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de plantas utilizadas popularmente para fins condimentares e medicinais. As espécies *Rosmarinus officinalis* L. e *Zingiber officinale* Roscoe, conhecidas popularmente como alecrim e gengibre, são utilizadas na culinária, na indústria farmacêutica e na medicina popular para tratar inúmeras afecções.

Dessa forma, o trabalho tem por objetivo determinar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim e gengibre frente microorganismos patogênicos, sendo estes *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e, avaliar a capacidade antioxidante destes compostos. Estas análises visaram determinar a real contribuição do alecrim e gengibre como antimicrobianos e antioxidantes de origem natural.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) frente às bactérias patogênicas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obter o óleo essencial de *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim);
- Determinar a composição química dos óleos essenciais por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/EM);
- Determinar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais por meio da difusão em disco e Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente às bactérias patogênicas;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos óleos essenciais através da captura do radical livre ABTS [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)].



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Compostos bioativos em matrizes vegetais

As plantas são utilizadas pelo homem desde a Antiguidade, na alimentação, na cura de doenças e também na agricultura. No Brasil, o emprego das plantas ocorre desde o período pré-colonial, quando índios já as utilizavam e, em seguida, transmitiram seus conhecimentos para os colonizadores, tornando-as amplamente utilizadas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças na medicina caseira (ANDRADE, 2010).

As plantas são uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (MARTINS, 2010). Relatos de pesquisadores da área de produtos naturais mostraram uma gama quase inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES et al., 2007). Apesar disso, os dados disponíveis demonstram que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial biológico.

Os compostos bioativos, caracterizados como constituintes ‘extranutricionais’, ocorrem naturalmente em pequenas quantidades nos vegetais. São classificados de acordo com suas estruturas químicas e funções biológicas, possuindo uma ampla gama de efeitos biológicos, destacando-se o antibacteriano, antiinflamatório e hepatoprotetor, a ação antirombótica, antiviral, anticancerígena e vasodilatadora. Muitas dessas funções são resultante da atividade antioxidante (PAIXÃO et al., 2007).

Compostos biologicamente ativos são divididos em dois grupos distintos: metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão presentes em todos os sistemas vivos e são essenciais ao desenvolvimento e a vida. Fazem parte desse processo substâncias como carboidratos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos (PROBST, 2012).

Os metabólitos secundários, no entanto, até pouco tempo atrás, não tinham função definida no organismo vegetal. Acreditava-se que estes constituintes eram produtos sem valor, ou mesmo resíduos metabólicos, super-expressão proteica, excreta ou desintoxicação das plantas. Todavia, a partir da década de 50, a função dessas substâncias, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas foi elucidado (CAVALCANTE, 2011). Estes compostos são produtos de metabolismo específico, distribuídos em toda extensão dos vegetais e atuam na defesa e adaptação da planta ao ambiente.

Pesquisas vêm sendo realizadas para aplicação dos compostos bioativos, isolados de plantas, como agentes terapêuticos, devido à sua ação antimicrobiana em microorganismos resistente aos antibióticos sintéticos e à atividade antioxidante.

### **3.1.1 Metabólitos secundários**

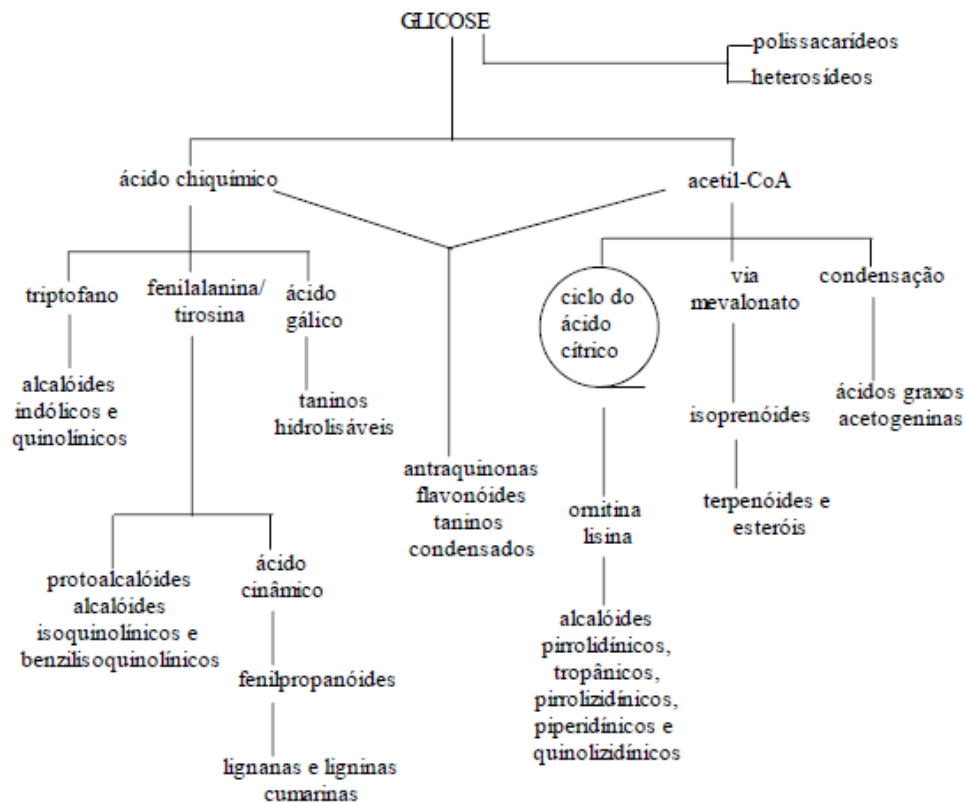
Ao longo do processo evolutivo, os organismos vegetais desenvolveram mecanismos de defesa para sua sobrevivência e, para isso, foram desenvolvidas rotas biossintéticas, atualmente conhecida como metabolismo secundário, que atuam na produção de substâncias nocivas e tóxicas para os inúmeros patógenos e herbívoros, na atração de polinizadores, permitindo a tolerância de temperaturas extremas e nos processos de adaptação a estresse hídrico ou deficiência de nutrientes do solo (PROBST, 2012).

Esses compostos são originados a partir dos metabólitos primários através de rotas biossintéticas complexas, participando diretamente das interações bioquímicas de convivência e comunicação entre as plantas e os vários organismos vivos no sistema ambiental (SIMÕES et al., 2004).

Como o metabolismo secundário responde a estímulos ambientais bastante variáveis, de natureza física, química ou biológica, fatores como fertilidade e tipo de solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura e poluição atmosférica, entre outros, podem influenciar e alterar a composição química dos vegetais (ANDRADE, 2010). Além disso, há interações e adaptações coevolutivos complexas que se produzem entre planta-planta, planta-animal e planta-microorganismo de um dado ecossistema (ALVES, 2001).

Apesar dos vegetais sintetizarem milhares de constituintes químicos, os metabólitos secundários são os que despertam grande interesse devido às atividades biológicas exercidas nas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente e, também, pela sua grande atividade farmacológica (SOARES, 2009). Muitos deles são de importância comercial nas áreas farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria e outras.

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados; no entanto, todos eles originam-se do metabolismo da glicose, tendo o ácido chiquímico e o acetato como intermediários principais (SIMÕES et al., 2007). Na Figura 1 verificam-se as principais rotas do metabolismo secundário.

**Figura 1** - Principais rotas do metabolismo secundário

Fonte: Simões et al. (2007)

Pereira (2006) afirma que, dentre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com maior atividade biológica são os alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais.

### 3.1.1.1 Óleos essenciais

Dentre os metabólitos secundários sintetizados pelos organismos vegetais, os óleos essenciais destacam-se por sua grande importância terapêutica e econômica, representando a segunda classe de compostos naturais, com maior número de compostos ativos (ANDRADE, 2010).

De forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipossolúveis, altamente voláteis, normalmente odoríferas e líquidas. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos que apresentam alto teor de azulenos, como o óleo essencial extraído da camomila e mil-folhas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são instáveis na presença de luz, calor, umidade, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que podem

catalisar reações de transformação e decomposição, uma vez que, devido a sua complexa constituição, tem alta probabilidade de sofrer transformações devido reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (BANDONI e CZEPAK, 2008).

Os principais constituintes dos óleos essenciais são os hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre, apresentando diferentes concentrações. Sua composição está constantemente em processo de modificação, mudando as proporções de seus constituintes ou transformando uns constituintes em outros, de acordo com a parte da planta, o momento do seu desenvolvimento ou o momento do dia e, apesar de ser determinada geneticamente, fatores abióticos também podem influenciar na proporção dos constituintes (ELPO e NEGRELLE, 2006; BANDONI e CZEPAK, 2008).

Bakkali et al., (2008), relata que os gêneros capazes de produzir óleo essencial estão divididos em várias famílias, sendo elas: *Myrtaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Cupressaceae*, *Zingiberaceae*, *Poaceae*, *Myristicaceae*, *Piperaceae*, dentre outras. Estes compostos podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores, folhas ou ainda nas cascas dos caules, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes (SIMÕES et al., 2007).

Para a extração dos óleos essenciais são utilizados vários métodos, os quais variam conforme a localização do óleo na planta e com o intuito de sua utilização. Os mais empregados são: enfloração (*Enfleurage*), hidrodestilação, arraste por vapor d'água, extração por solventes orgânicos, prensagem (ou expressão) e extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (MARTINS, 2010).

No ambiente natural, os óleos essenciais estão associados a adaptações necessárias à sobrevivência do organismo vegetal no ecossistema, exercendo papel primordial na defesa contra bactérias, fungos, vírus, insetos e herbívoros, e também na atração de alguns insetos e outros agentes fecundadores, como pássaros e morcegos (BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são utilizados desde a Antiguidade como flavorizantes na fabricação de cosméticos e perfumarias, e farmacologicamente com fins medicinais, no entanto, somente nas últimas décadas o uso destes compostos como antimicrobianos naturais se intensificaram com a sua aplicação na conservação de alimentos e no controle de enfermidades de origem microbiana. Como agentes antimicrobianos, os óleos essenciais apresentam baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana devido a sua composição complexa, possuindo diferentes mecanismos de ação antimicrobiana, o que dificulta a adaptabilidade dos microorganismos (DAFERERA, 2003).

## 3.2 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que agem sobre microorganismos inibindo o seu crescimento, exercendo sua ação a nível molecular, no processo metabólico ou na estrutura celular dos microorganismos (MOTA et al., 2010).

Estas substâncias são essenciais para prevenção, controle e tratamento de infecções bacterianas em homens e animais. No entanto, o uso indiscriminado e prolongado desses agentes têm causado o surgimento e prevalência de microorganismos resistentes. O impacto da resistência é crítico, uma vez que as opções terapêuticas restringem-se ao uso de poucas drogas (POZZATTI et al., 2006). A indústria químico-farmacêutica busca soluções e, neste cenário, os metabólitos secundários, tradicionalmente utilizados na culinária e na medicina popular, surgem como uma alternativa eficaz e econômica para os antimicrobianos sintéticos.

### 3.2.1 Resistência bacteriana

A resistência bacteriana pode ser definida como a capacidade temporária ou permanente do microorganismo de permanecer viável e/ou multiplicar-se sob condições que poderiam destruir ou inibir outras cepas filogeneticamente relacionadas. Analogamente, pode afirmar-se que uma bactéria é resistente quando não é suscetível a uma concentração de agente antimicrobiano utilizado na prática (GRANATO, 2011).

Uma consideração importante é que o amplo uso de antibióticos não só seleciona bactérias resistentes a drogas, mas também exerce pressão seletiva na microbiota comensal normal. Estas bactérias, especialmente habitantes do trato intestinal, são constantemente expostas a antibióticos e podem desenvolver resistência a fim de sobreviver, tornando-se um importante reservatório de genes de resistência. Quando excretados para o ambiente, por meio de fezes, contaminam outros ecossistemas, podendo alcançar os seres humanos direta ou indiretamente, infectando ou colonizando-os (KNEZEVIC e PETROVIC, 2008).

A resistência a antimicrobianos pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca, ou natural, ocorre devido a uma característica estrutural ou funcional da bactéria que permite a tolerância a uma determinada classe de antimicrobianos pelos membros de um grupo de bactérias. De forma mais específica, este mecanismo refere-se a uma insensibilidade, já que ocorre em bactérias que nunca foram sensíveis à droga. Este mecanismo de resistência limita a gama de drogas disponíveis para tratamento e conseqüentemente aumenta o risco associado com a resistência adquirida (AARESTRUP, 2005; GRANATO, 2011).

Já a resistência adquirida, ocorre quando uma bactéria que é sensível ao antibiótico desenvolve resistência a ele através de mutação ou aquisição de novo DNA, incorporando genes provenientes de outros microorganismos por diferentes sistemas de transferência genética. Este tipo de resistência é umas das maiores ameaças para saúde humana e animal, pois causa propagação da resistência em populações bacterianas susceptíveis e consequentemente pode conduzir a uma falha terapêutica (AARESTRUP, 2005; GRANATO, 2011).

### 3.2.2 Antimicrobianos naturais

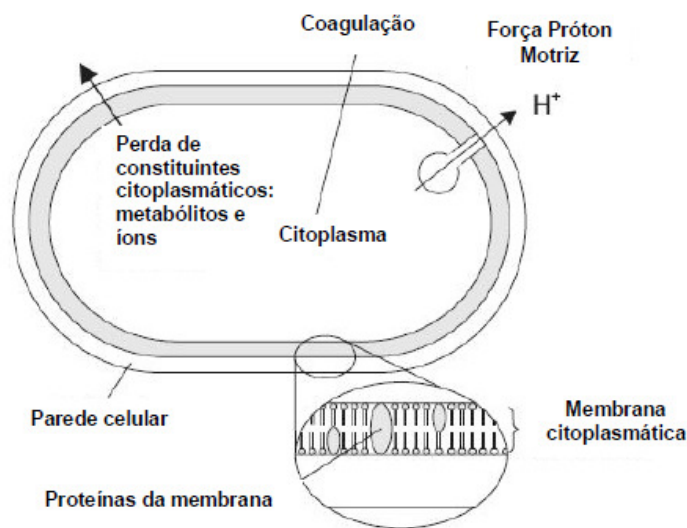
Além do cenário da resistência bacteriana, tem-se o fato agravante de que os compostos sintéticos utilizados para a conservação de alimentos podem ser responsáveis por atributos carcinogênicos, teratogênicos e também apresentar toxicidade residual (MOREIRA et al., 2005). Estudos vem mostrando que os compostos de natureza vegetal, em especial os óleos essenciais, apresentam grande potencial como agentes de inibição do crescimento de microorganismos. Estes compostos demonstram atividade biológica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de eficaz atividade antimicrobiana contra fungos, protozoários e vírus, surgindo, desta forma, como alternativa aos compostos sintéticos utilizados (SIENKIEWICZ, 2011).

A atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais representa, de certa maneira, uma extensão da própria função que desempenham nas plantas, onde atuam na defesa destes organismos contra patógenos e predadores. Devido à complexidade da composição química dos óleos essenciais, a inibição dos microorganismos não pode ser explicada por um único mecanismo de ação. Todavia, uma importante característica dos óleos essenciais, a lipofilicidade, permite que estes passem através da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípídios, quebrando-os e, assim, alterando a permeabilidade dessas organelas (BURT, 2004; LAMBERT et al., 2001).

Nas células bacterianas, a alteração da permeabilidade está associada à perda de íons e à redução do potencial da membrana, ao colapso da bomba de prótons e ao esgotamento de ATP (DI PASQUA et al., 2006). Alterando a permeabilidade da parede celular e da membrana plasmática, permite-se a saída de íons e do conteúdo celular, o que modifica o equilíbrio celular, podendo levar à liberação de macromoléculas e à lise celular (COX et al., 2000; LAMBERT et al., 2001).

Óleos essenciais ainda são capazes de causar coagulação do citoplasma, danificar lipídeos e proteínas e afetar a atividade geral da célula, como controle da pressão de turgor, transporte de solutos e regulação do metabolismo, como síntese de RNA, DNA, proteínas e polissacarídeos (BURT, 2004). Os locais e os mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana estão representados na Figura 2.

**Figura 2** – Locais e mecanismos de ação esquemáticos dos óleos essenciais na célula bacteriana



Fonte: Adaptado de Burt (2004)

### 3.3 Bactérias patogênicas

Bactérias patogênicas são aquelas que penetram o organismo, causando transtornos mais ou menos severos, desenvolvendo-se para deterioração deste organismo. Os principais agentes patogênicos têm como características em comum o curto período de incubação, quadro clínico gastrointestinal, acompanhado ou não de febre (DIEMER, 2016).

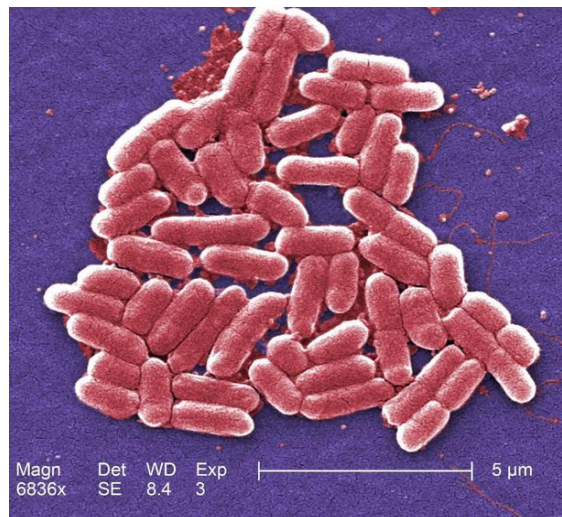
A presença de bactérias nos alimentos é uma das principais razões de sua deterioração, o que resulta na redução da vida de prateleira e possibilita, ainda, a veiculação de patógenos, acarretando potenciais riscos à saúde pública. Desta forma, é necessário um controle efetivo para garantia da qualidade em todos os estágios, desde sua elaboração até o produto final (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

Vários dados disponíveis de surtos de intoxicação/infecção alimentar apontam como agentes mais frequentes os de origem bacteriana, sendo eles *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2010).

### 3.3.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* são bacilos Gram-negativos com diâmetro de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm (Figura 3), pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, não esporulados, aeróbicos ou anaeróbico facultativos, capazes de fermentar a glicose e outros carboidratos, produzindo ácido pirúvico que é convertido em ácido lático, acético ou fórmico com produção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. São imóveis, porém alguns têm a capacidade de mobilidade, devido à presença de flagelos peritricos. Podem crescer entre pH de 4,4 a 9, mas são conhecidos pela sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, o que lhes possibilita sobreviver no trato gastrointestinal (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2000).

**Figura 3** – *Escherichia coli*



Fonte: [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com)

Este microorganismo é predominante na microbiota do trato intestinal de humanos e de outros animais, e em decorrência disso, é utilizado como indicador de contaminação direta ou indireta de origem fecal em água e alimentos (MARTINS, 2010). Sua detecção pode indicar também, a possível presença de outros microorganismos ainda mais patogênicos para o homem.

Além das cepas não patogênicas que habitam o trato entérico de humanos e animais saudáveis, existem cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. Os patótipos de *E. coli* são classificados como patogênicos de origem entérico e patogênicos extraintestinais. O primeiro grupo é causador de diarreias em humanos e animais e, o segundo causa infecções do trato



urinário e inflamação generalizada causada por infecção e meningites (KUHNERT et al., 2000).

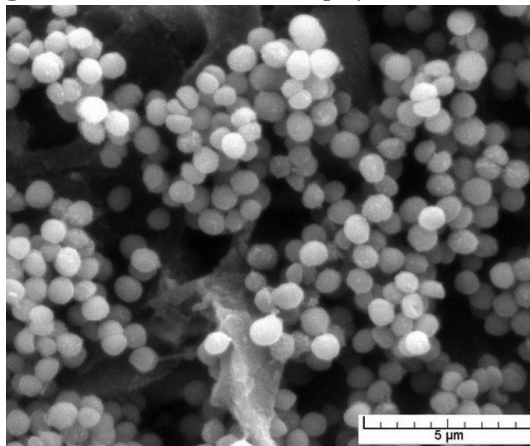
As linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são divididas em seis classes, de acordo com os fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas: EPEC (enteropatogênica clássica); EIEC (enteroinvasora); ETEC (enterotoxigênica); EHEC (enterohemorrágica), DAEC (difusamente adesiva) e EAaggEC (enteroagregativa) (ANDRADE, 2010).

A contaminação com *E. coli* pode se dar em função do consumo de alimentos com deficiências no processo de fabricação, sendo esta muitas vezes uma contaminação resultante da falta de higiene pessoal, manipulação inadequada por parte do colaborador ou também matéria prima e processos em desacordo com os princípios higiênico sanitários (DIEMER, 2016).

### 3.3.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos dispostos em cachos, crescendo na maioria dos meios bacteriológicos, em condições aeróbicas ou anaeróbicas. As colônias, que podem ser observadas na Figura 4, variam de acinzentadas a amarelo-ouro e têm formas circulares, lisas, elevadas e brilhantes (CASSETTARI et al., 2005). Este é um microorganismo coagulase positivo e oxidase negativa; pode crescer em uma ampla margem de temperatura, tem como limite inferior e superior 7°C e 49°C, respectivamente, e a produção de toxinas ocorre no intervalo de 10°C – 48°C, no entanto sua faixa ótima é de 40°C – 45°C (ANDRADE, 2010; TORTORA, 2000).

**Figura 4** – Colônias de *Staphylococcus aureus*



Fonte: [www.bacteriainphotos.com](http://www.bacteriainphotos.com)

Este microorganismo pode ser encontrado em ambiente externo e em narinas de 20-40% dos adultos, enquanto que 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente, o que aumenta os riscos de contaminação de alimentos manipulados, sendo os produtos lácteos os principais substratos alimentícios para esse microorganismo (BANIA et al., 2006).

A intoxicação por *S. aureus* ocorre quando essas bactérias multiplicam-se nos alimentos, armazenados em temperaturas inadequadas, e produzem uma toxina termoestável. A enterotoxina estafilocócica, por ser termoestável, pode permanecer no alimento mesmo após o cozimento possibilitando, desta forma, a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar (CARMO et al., 2008). Algumas linhagens de *Staphylococcus* produzem a toxina da síndrome do choque tóxico cujos sintomas são agudos, potencialmente fatais e caracterizados por febre alta, descamação da pele e hipotensão (SANTOS, 2003).

As diversas espécies de *Staphylococcus* destacam-se pela capacidade de se tornarem resistentes a grande número de drogas antibacterianas. O agravamento da resistência bacteriana está associado ao uso indiscriminado de drogas antibacterianas, que permitiu que os microorganismos conseguissem se adaptar por mecanismos de aquisição e transferência de genes de resistência aos antibióticos (CASTANHEIRA, 2013).

### **3.4 Antioxidantes**

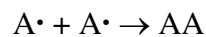
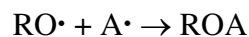
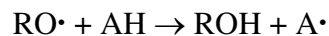
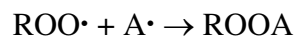
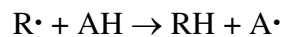
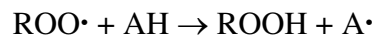
Antioxidantes são compostos que diminuem ou impedem a oxidação de substratos oxidáveis. Em relação aos alimentos, um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis (SHIMANO, 2012).

Estas substâncias podem estar presentes naturalmente nos alimentos, mas também podem ser formadas durante o processamento ou serem adicionadas aos produtos. Além de prolongar a vida útil do produto, os antioxidantes reduzem o desperdício de matéria-prima, minimizam as perdas nutricionais e aumentam a gama de lipídeos que podem ser utilizados em produtos específicos (SICHERI, 2013).

Para a aplicação em alimentos, é desejável que os antioxidantes possuam certas características. Dentre elas estão a eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%), ausência de efeitos indesejáveis na cor, odor ou sabor dos alimentos, estabilidade durante o processamento e armazenamento, além disso, devem apresentar baixo custo (CALVACANTE, 2011).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação em primário, ou de quebra de cadeia, e em secundário ou preventivo. Os antioxidantes primários possuem em sua constituição um núcleo fenólico, com diversas permutações no anel, e agem sequestrando os radicais livres. Por serem melhores doadores de hidrogênio do que as moléculas lipídicas insaturadas, os antioxidantes primários doam átomos de hidrogênio aos radicais livres ( $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{R}\cdot$ ), o que os torna indisponíveis para a propagação da reação em cadeia. Assim, espécies inativas são formadas. O radical oriundo da reação com o substrato ( $\text{A}\cdot$ ) é estabilizado por ressonância e, devido a isso apresenta reatividade baixa (REISCHE et al., 2008). A Figura 5 representa o mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

**Figura 5** - Mecanismos de ação para antioxidantes primários, onde  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  e  $\text{R}\cdot$  - radicais livres;  $\text{AH}$  – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e  $\text{A}\cdot$  – radical inerte.



Fonte: Wansundara e Shahidi, 2005

Os antioxidantes secundários agem por meio de vários possíveis mecanismos. A principal diferença em relação aos antioxidantes primários, é que os secundários não convertem os radicais livres em molécula estáveis. Eles agem como quelantes de metais pró-oxidantes desativando-os, doadores de átomos de hidrogênio a antioxidantes primários, desativadores do oxigênio singlete, supressores de oxigênio, absorvedores da radiação ultravioleta e são capazes de decompor hiperóxidos em espécies não radicais. Frequentemente promovem a melhora no desempenho dos antioxidantes primários (REISCHE, 2002).

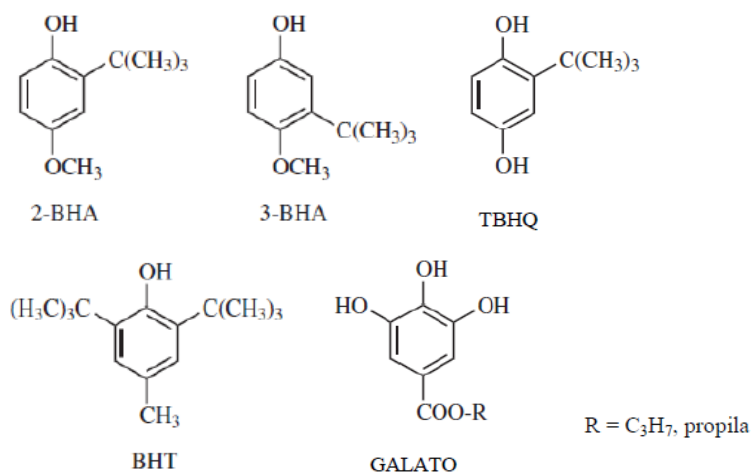
Os antioxidantes primários mais comumente utilizados em alimentos são compostos sintéticos. Alguns compostos naturais também exercem esta função, no entanto, por meio de mecanismos diferentes. Pertencem a este grupo os tocoferóis e os carotenoides (TIVERON, 2010). Os compostos presentes em plantas podem ser incluídos como antioxidantes mistos.

### 3.4.1 Antioxidantes sintéticos

Na indústria de alimentos, os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados para estabilizar óleos, gorduras e alimentos lipídicos. São substâncias que tiveram seu uso aprovado em alimentos após investigações que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária. Por esta razão, estão sujeitas às legislações específicas de cada país ou normas internacionais (TAKEMOTO et al., 2009).

São principalmente compostos de natureza fenólica, podendo ou não ser empregados em combinação. Os mais utilizados pela indústria são o butil- hidroxi-anisol (BHA), butil- hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e galato de propila (GP), cujas estruturas estão representadas na Figura 6 (ANDRADE, 2010). No Brasil, as concentrações máximas permitidas em óleos e gorduras são de 100mg/Kg para o BHT e o GP, e 200 mg.Kg<sup>-1</sup> para o BHA e o TBHQ, e de 200 mg.Kg<sup>-1</sup> (sobre o teor lipídico) de BHA, BHT, GP e TBHQ em margarinas (BRASIL, 2005).

**Figura 6** – Estruturas químicas dos antioxidantes sintéticos BHA, TBHQ BHT e GP.



Fonte: Adaptado de Regitano-d'Arce (2006)

Apesar de serem muito efetivos e estáveis, os antioxidantes sintéticos apresenta uso restrito devido á possibilidade de causarem efeitos indesejáveis em enzimas de vários órgãos humanos, inflamações e formação de tumores (BAUER et al., 2001; TIVERON, 2010). Países da União Europeia e o Canadá não permitem o uso de TBHQ em alimentos (REISCHE et al., 2008).

A toxicidade apresentada pelos antioxidantes sintéticos e a crescente conscientização dos consumidores pela busca de alimentos com efeitos benéficos para saúde,

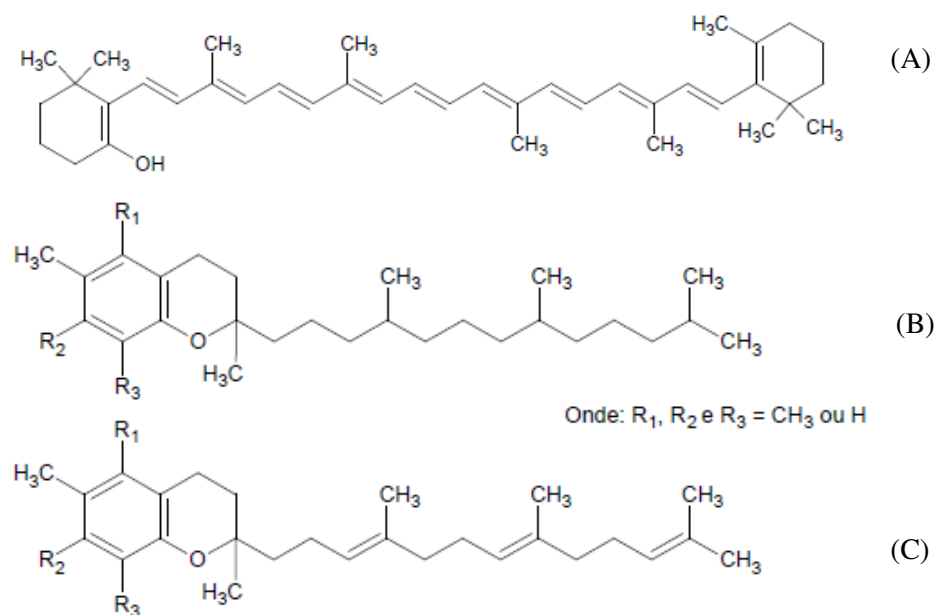
microbiologicamente seguros e com longa vida de prateleira, têm resultado em um grande número de pesquisas sobre compostos bioativos, que permitirão a substituição dos compostos sintéticos ou a associação entre eles, com a finalidade de diminuir a sua concentração nos alimentos.

### 3.4.2 Antioxidantes naturais

A utilização de plantas aromáticas, condimentares e medicinais para preservar os alimentos e evitar o desenvolvimento do sabor de ranço é uma prática realizada desde a antiguidade. Óleos essenciais e extratos obtidos de plantas tem sido objeto de pesquisas em relação a sua atividade antioxidante, tendo seu potencial antioxidante comprovados em diversos sistemas-modelo, atuando na remoção de radicais livres, na quebra da cadeia da oxidação lipídica e também regenerando outros antioxidantes por ação sinérgica (SICHERI, 2013).

Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se os compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, taninos hidrolisáveis, lignanas, cumarinas, estilbenos, além do ácido ascórbico, tocoferóis, tocotrienóis e carotenoides (SHIMANO, 2012). Estes compostos, individualmente ou em sinergia, podem agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema efetivo contra ação dos radicais livres.

**Figura 7** – Estruturas químicas do antioxidante natural tocoferol (A), tocotrienol (B) e carotenoide ( $\beta$ -caroteno).



Fonte: Adaptado de Cavalcante (2011)

Ruberto e Baratta (2000), avaliando a atividade antioxidante de aproximadamente 100 compostos que compõem os óleos essenciais, verificaram que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante, seguido dos componentes oxigenados e dos alcoóis alílicos. Alguns hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos apresentaram significativo efeito antioxidante.

Devido as suas propriedades antioxidantes, os compostos fenólicos têm recebido grande importância nos últimos anos. Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, e, que apresentam grande variedade de função nos vegetais (TIVERON, 2010). São produtos do metabolismo secundário das plantas, estando envolvidos em mecanismos de defesa contra radiação e patógenos.

A atividade antioxidante desses compostos se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na quelatação de metais de transição ou no sequestro de radicais livres, agindo nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo. O mecanismo da ação antioxidante dos compostos fenólicos permite a formação de intermediários relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (TIVERON, 2010).

### 3.4.3 Medidas da capacidade antioxidante

O conhecimento sobre os constituintes dos vegetais responsáveis pelas propriedades antioxidantes tem sido alvo de interesse de pesquisadores, profissionais da área médica e nutricional e consumidores. Devido à complexidade e variedade da composição dos compostos vegetais, o isolamento e estudo de cada substância são praticamente inviáveis, além de onerosos.

Existe uma ampla gama de testes que avaliam as substâncias antioxidantes presentes em matrizes vegetais. De um modo geral, duas abordagens são utilizadas nestas análises. A primeira envolve a geração de uma espécie de radical livre e a medição direta de sua inibição causada pelo composto em teste. A segunda utiliza sistemas de ensaio que envolve a oxidação de um substrato por radicais livres gerados, onde é medida a capacidade de retardar ou inibir a oxidação lipídica (RAVELLI, 2011).

Dentre os sistemas utilizados para se estimar a capacidade antioxidante estão o ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), que mede o sequestro de radicais peroxil gerados por uma fonte radicalar; o DPPH (2,2 -difênil -1- picril –hidrazil), que é baseado na capacidade do composto em reagir com doadores de hidrogênio; o FRAP (Ferric Reducing Antioxidant

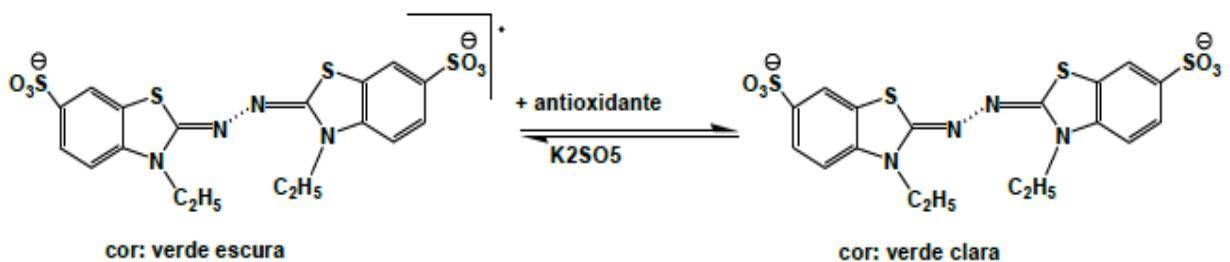
Power), que está baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  em  $\text{Fe}^{2+}$  e o ABTS (2, 2-azinobis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico), que consiste em se monitorar a redução do cátion-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  quando um composto antioxidante é adicionado (TIVEREON, 2010).

O sistema ABTS vem sendo bastante utilizado na determinação da atividade antioxidante de matrizes vegetais devido a sua relativa simplicidade operacional, o que possibilita a aplicação em rotinas de laboratório.

### 3.4.3.1 Método ABTS

O método do radical ABTS foi primeiramente sugerido por Miller et al. (1993) em testes de amostras biológicas, e, atualmente é utilizado uma modificação do método original, proposta por Re et al. (1999), que é baseado na geração do cátion-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  de coloração azul esverdeado, pela adição de persulfato de potássio, caracterizado pela absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução/sequestro do radical promovendo a perda de coloração do meio reacional, como é observado na Figura 8. A porcentagem de inibição do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é calculada em função da concentração dos antioxidantes.

**Figura 8** - Estabilização do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  por um antioxidante



Fonte: Adaptado de RUFINO *et al.*, (2007).

O radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pode ser dissolvido em água ou em soluções de etanol, portanto pode ser aplicado ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais. Moon e Shibamoto (2009) citaram a aplicação deste método na avaliação da atividade antioxidante de frutas, vegetais, plantas medicinais, vinhos e uvas, cereais, bebidas e óleos essenciais.

A ação do cátion-radical  $ABTS^{\cdot+}$  sobre os antioxidantes pode ocorrer pela doação de átomos de hidrogênio, pela transferência de elétron ou pela combinação destes dois mecanismos (SICHERI, 2013).

Segundo Souza (2013), o método  $ABTS^{\cdot+}$  é simples e pode ser avaliado em diferentes faixas de pH, o que torna essa metodologia importante para o conhecimento do efeito do pH em mecanismos oxidantes. Porém, esse método tem a limitação de não ser um representante das biomoléculas e nem mesmo ser encontrado em nenhum sistema biológico.

### 3.5 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

De nome popular alecrim, *Rosmarinus officinalis* L., apresenta diversos outros sinônimos: alecrim de cheiro, alecrim das hortas, alecrim da casa, alecrim-comum, alecrim-verdadeiro, rosmaninho. É uma espécie pertencente à família Lamiaceae, compreendendo 150 gêneros com cerca de 2800 espécies, sendo muitas dessas plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais. Dentre os gêneros cultivados destacam-se várias espécies usadas como condimentos, tais como: erva-cravo (*Hyptis*), alfavaca (*Ocimum*), alecrim (*Rosmarinus*), hortelã-pimenta (*Mentha*), manjerição (*Origanum*), manjerona (*Majorana*), basilicão (*Basilicum*), orégano (*Origanum*), tomilho (*Thymus*) e erva-cidreira (*Melissa*). Outras são cultivadas como flores ornamentais ou para produção de óleo essencial, como: sálvia (*Salvia*), alfazema (*Lavandula*) e patchuli (*Pogostemum*) (SHIMANO, 2012).

O Alecrim foi cultivado primeiramente no Mediterrâneo, transplantado para a China e agora é cultivado em todo o mundo, principalmente na Espanha, Marrocos e Tunísia, que são também os principais produtores do seu óleo (FLAMINI et al., 2002;). Diferentes espécies de alecrim são encontradas, a saber: *R. officinalis*, *R. eriocalyx*, *R. laxiflorus*, e *R. La Vandulaceus*. No entanto, *R. officinalis* é o único que cresce naturalmente nas regiões Mediterrâneas (ANGIONE et al., 2004).

A espécie é um subarbusto muito ramificado de 0,50 a 1,50 m de altura, sempre verde, com hastes lenhosas, folhas pequenas, sésseis, finas, opostas e lanceoladas, de flores azuis ou brancas e sabor picante (RIBEIRO, 2011). A planta exala aroma forte e agradável, apresentando emprego culinário, medicinal, farmacêutico e aromático, sendo o óleo essencial aplicado em cosméticos e perfumaria.



**Figura 9** - Parte aérea de *Rosmarinus officinalis* L.



Fonte: jardim.esobre.com

Na culinária o alecrim é utilizado na panificação, em preparações que contenham carne, para adornar saladas, em caldos verdes, sobremesas, biscoitos, geleias, saladas de frutas, marmeladas e vinhos quentes. Nos Estados Unidos é utilizado em carnes, aves, peixes e linguiças e no Marrocos é adicionado à manteiga e a outros alimentos para aumentar a vida de prateleira dos produtos (PORTE e GODOY, 2001). Na farmacologia é empregado *in natura*, como outras plantas vegetais ricas em óleos voláteis, na preparação de infusões ou na aromatização de fórmulas destinadas ao uso oral.

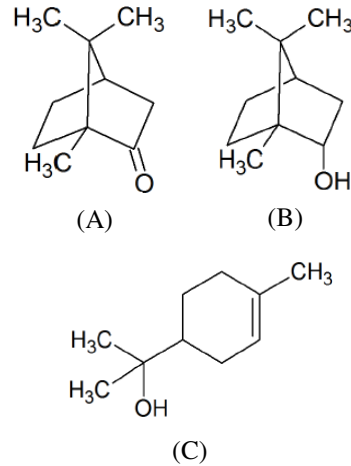
O alecrim é amplamente estudado por apresentar propriedades antibacteriana, antioxidante, antimutagênica, analgésica, antiespasmódica, anti-inflamatória, citotóxica, vasodilatadora e quimiopreventivas (FARIA, 2005; HUSSAIN et al., 2014).

Na medicina popular, é utilizado no tratamento de afecções hepática, intestinal, renal e respiratória; em problemas de debilidade cardíaca (cardiotônico), como antidepressivo natural e como cicatrizante (uso tópico) (LIMA, 2014; PENTEADO, 2008). Além disso, seu óleo essencial pode ser incorporado em unguentos para reumatismo eczema, úlcera e feridas (PORTE e GODOY, 2001). Segundo Rozman e Jersèk (2009), *R. officinalis* possui o óleo mais utilizado em todo o mundo em função de suas propriedades biológicas.

O óleo essencial do alecrim é obtido a partir de suas folhas e sumidades floridas. Santoyo et al. (2005) identificou 33 compostos químicos no óleo essencial desta espécie, sendo os principais:  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo. Este óleo essencial pode ser classificado de três formas em relação a sua

composição química, *cineoliferum* (alto teor de 1,8-cineol, 53-67%); *camphoriferum* (cânfora >20%) e *verbenoniferum* (verbenona >15%) (NAPOLI et al., 2010).

**Figura 10** - Moléculas de 1,8-cineol (A), cânfora (B) e  $\alpha$ -terpineol (C) presentes no óleo essencial de alecrim.



Fonte: Diemer (2016)

### 3.6 Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)

O gengibre, de nome científico, *Zingiber officinale* Roscoe, foi primeiramente descrito em 1807, pelo botânico inglês Willian Roscoe. É uma espécie pertencente à família Zingiberaceae, proveniente da região sudoeste da Ásia e do Arquipélago Malaio, incluindo mais de 1200 espécies e 53 gêneros.

No Brasil, seu cultivo foi introduzido logo após o início da colonização europeia. No entanto, somente nas últimas décadas, com a introdução de variedades de rizomas gigantes por agricultores japoneses, a cultura do gengibre tornou-se efetivamente comercial no Brasil, especialmente nos litorais de Santa Catarina, São Paulo e do Paraná (MARTINS, 2010).

A planta do gengibre possui hábito herbáceo, é perene, produz rizoma articulado, possui raízes adventícias e folhas dísticas, sendo as brasileiras reduzidas, brácteas florais obovadas, cada uma envolvendo uma só flor (SOARES, 2009). O rizoma do gengibre apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com uma coloração que vai do amarelo couro à marrom brilhante, é estriado na longitudinal, algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos” que surgem obliquamente dos rizomas. Internamente, de cor marrom-amarelada, apresenta uma endoderme amarela, com números feixes fibrovasculares e

abundantes células oleaginosas (MARTINS, 2010). Apresenta odor agradável e aromático e sabor fortemente pungente.

**Figura 11** - Rizomas do gengibre



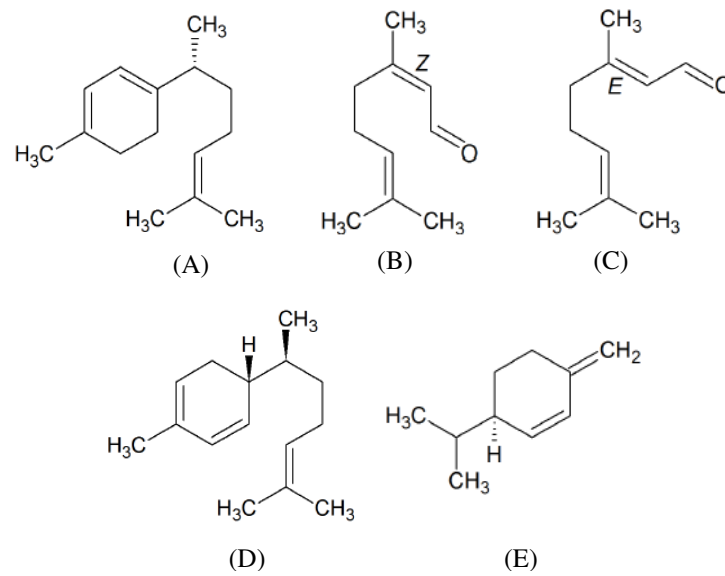
Fonte: EMBRAPA, 2001

Como planta medicinal, o gengibre é uma das mais antigas e populares do mundo. É utilizado para aliviar sintomas como inflamação, doenças reumáticas e desconfortos gastrointestinais (PFEIFFER et al., 2006). Sua raiz possui propriedades carminativas, digestivas, sudoríficas, antigripais e estimulantes (SOARES, 2009). Na culinária, o gengibre é utilizado como condimento e aromatizante, conferindo características picantes e refrescantes às receitas; é matéria-prima para fabricação de bebidas e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geleias. Na indústria cosmética seu emprego é devido a sua fragrância.

O gengibre tem mostrado uma variedade de atividades biológicas, tais como: antifúngica, antiinflamatória, antiviral, antibacteriana, antiulcerativa, antioxidante, antitumoral (CAMARGO, 2006; DIEMER, 2016; SHUKLA e SINGH, 2007; SINGH et al., 2008). E devido a estas propriedades, o uso dos rizomas para a obtenção de óleos essenciais, extratos e concentrados de gengibre têm despertado interesse das indústrias farmacêuticas e alimentares.

Jaded (2005) verificou a presença de 63 constituintes ao avaliar a composição do óleo essencial de gengibre produzido no Havaí. Segundo Soares (2009), cerca de 50 constituintes já foram identificados, sendo os principais:  $\alpha$ -zingibereno, geranial,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -farneseno, cineol, canfeno, neral, geraniol,  $\gamma$ -curcumeno,  $\beta$ -bisabolneo, terpineol e zingiberol, eucalipitol e acetato de geranila.

**Figura 12** - Moléculas de  $\gamma$ -curcumeno (A), neral (B), geranial (C),  $\alpha$ -zingibereno (D) e  $\beta$ -felandreno (E) presentes no óleo essencial de gengibre.



Fonte: Adaptado de Diemer (2016)

## 4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 4.1 Material vegetal

As folhas de *Rosmarinus officinalis* L. e os rizomas do *Zingiber officinale* Roscoe foram coletados no município de São Luís – MA no período de janeiro a março de 2015. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Bromatologia do Programa de Controle de Qualidade de Alimentos e Água (PCQA) da Universidade Federal do Maranhão, onde foram submetidas às etapas de seleção manual e lavagem com água corrente. Logo após, o material vegetal foi submetido à extração do óleo essencial.

### 4.2 Obtenção dos óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas a partir do material vegetal fresco pelo método de hidrodestilação, utilizando-se o sistema Clevenger. Neste processo, foram utilizados cerca de 500g de rizomas de gengibre triturados e 200 g de folhas de alecrim; em seguida, transferiu-se a massa para um balão de fundo redondo (6000 mL) e acrescentou-se água destilada na proporção de 1:10.

A extração foi efetuada durante um período de quatro horas e em seguida, os óleos essenciais obtidos foram separados do hidrolato pela adição de sulfato de sódio anidro, seguido de armazenamento em frascos de vidro âmbar sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes.

O rendimento do óleo essencial foi expresso em porcentagem na relação massa/volume pela medida da densidade, observando o volume de óleo essencial obtido na extração por massa de material vegetal, conforme a fórmula descrita abaixo (FABROWSKI,2002).

$$\%R = \left[ V(\text{ml}) * \frac{d\left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right)}{M(\text{g})} \right] * 100 \quad (1)$$

### 4.3 Análises da composição química dos óleos essenciais

As análises dos constituintes dos óleos essenciais de alecrim e gengibre foram realizadas no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo por

cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM). O cromatógrafo utilizado foi o da marca SHIMADZU equipado com coluna capilar fenilpolisilfenileno-siloxano de BPX 5%, (30 m comprimento; 0,25 mm de espessura; 0,25 µm de espessura do filme) acoplado a espectrômetro de massa. O gás de arraste utilizado foi o hélio.

A temperatura do injetor e interface do cromatógrafo com detector seletivo foi mantida em 280 °C com fluxo na coluna de 2,7 mL/min, programada para operar em 50 °C. Para as análises, foram injetadas alíquotas com volume de 1 µL em acetato de etila, fixando-se as seguintes condições: modo de divisão com pressão da coluna de 150 kPa, velocidade linear 59,1, com fluxo total de arraste 30 mL/min, modo de varredura 0,5 segundos.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massas com espectros da base de dados (ADAMS, 2007; NIST, 2005). Os dados quantitativos foram obtidos das porcentagens das áreas do cromatograma através de normalização.

#### **4.4 Determinação da atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de alecrim e gengibre foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima (CIM).

##### **4.4.1 Microorganismos testados**

Foram utilizadas duas cepas microbianas provenientes da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) doadas pelo Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA), que foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A identificação das cepas foi confirmada pelo uso de ensaios bioquímicos, seguindo as recomendações do manual de microbiologia clínica (MURRAY et al., 2003).

##### **4.4.2 Preparo do inoculo bacteriano**

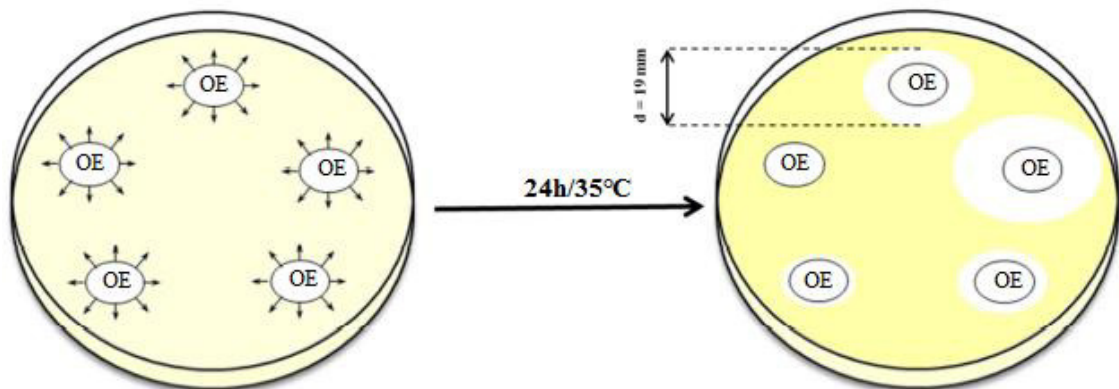
As cepas microbianas utilizadas foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma suspensão microbiana com a turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), de acordo com as normas do National

Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Os inóculos utilizados em todas as técnicas foram preparados da mesma forma.

#### 4.4.3 Difusão em Ágar

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão foram realizados segundo CLSI (2009). Primeiro, foram preparadas as placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH); após sua solidificação 100  $\mu\text{L}$  da suspensão microbiana foi distribuída na superfície do ágar e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 min. Enquanto isso, foram preparados os discos contendo 50 $\mu\text{L}$  do óleo essencial. Utilizando-se pinça esterilizada, os discos foram dispostos sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas e posteriormente foi realizada a leitura do halo de inibição (Figura 13). O procedimento foi realizado em triplicata.

**Figura 13** - Representação do método de difusão em disco com óleo essencial.



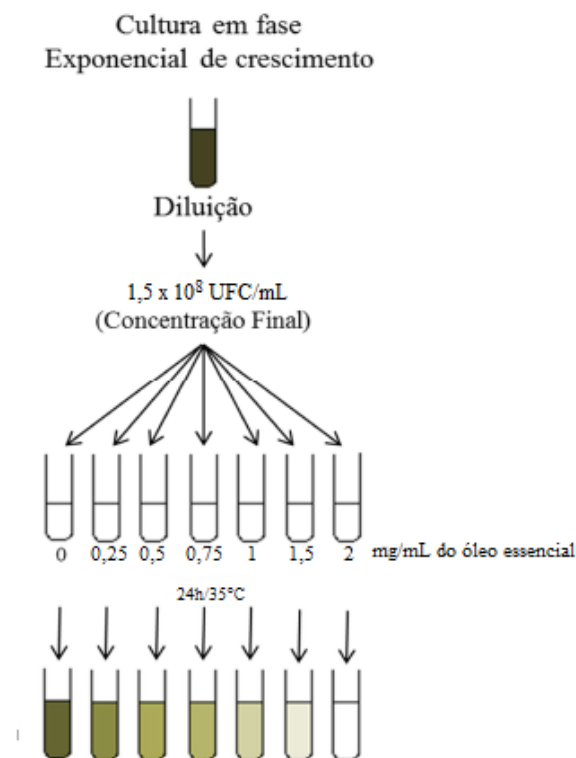
Fonte: Adaptado de Taveira et al (2008).

#### 4.4.4 Concentração Inibitória mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima foi realizada segundo a metodologia de diluição em meio líquido, proposta pela National Committee for Clinical Laboratory Standart (NCCLS, 2003) com as bactérias utilizadas nas técnicas de difusão em meio sólido. Inicialmente, uma alíquota dos óleos essenciais na concentração de 2.000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  preparados numa solução de dimetilsufóxido (DMSO) a 12, 0% foi transferida para tubo de ensaio contendo caldo BHI. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas resultando nas concentrações de 2000 a 75

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A suspensão microbiana ( $50\ \mu\text{L}$ ) contendo  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL dos microorganismos foi adicionada a cada concentração (Figura 14). Realizou-se o controle constituído apenas da solução de DMSO nas mesmas concentrações testadas. Foram reservados tubos para controle de esterilidade do caldo e de crescimento bacteriano. Em seguida, os tubos foram incubados a  $35^\circ\text{C}$  por 24 horas.

**Figura 14** - Representação esquemática da CIM de um óleo essencial pelo método de diluição em meio líquido.



Fonte: Adaptado de Taveira et al (2008).

Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento em Ágar Plate Count (PCA), meio ideal para se realizar a leitura do crescimento bacteriano, e incubou-se em estufa a  $35^\circ\text{C}$  por 24 h. Logo após 24 horas, foram realizadas as leituras de inibição/crescimento microbiano obtendo-se a CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano.

#### 4.5 Avaliação da capacidade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método ABTS [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)], sendo realizada conforme a metodologia sugerida por Re et



al. (1999), com modificações. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi preparado pela reação de 5,0 mL de uma solução 3840 µg.mL<sup>-1</sup> de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio 37.840 µg.mL<sup>-1</sup>, a mistura foi deixada à temperatura ambiente, em ambiente escuro, por 16 horas. Após a formação do radical a mistura foi diluída em etanol (1:30 v/v aproximadamente) até se obter uma absorbância de 0,7 nm a 734 nm.

A partir das soluções-mãe na concentração de 2000 µg.mL<sup>-1</sup> dos óleos essenciais, preparou-se diluições seriadas obtendo-se concentrações de 5 a 30 µg.mL<sup>-1</sup>; com essas soluções, preparou-se a mistura reacional com o cátion radical ABTS. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 3,0 mL da mistura e homogeneizou em agitador de tubos e após 6 minutos realizou-se a leitura da absorbância da mistura reacional em espectrofotômetro em comprimento de 734 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi expressa como a capacidade de inibir/reduzir radicais ABTS em porcentagem (%I), de acordo com a Equação 1, e pelo valor de CE<sub>50%</sub>.

$$\% \text{ de Inibição} = \frac{(\text{Abs. solução do radical ABTS} - \text{Abs. da amostra}) \times 100}{\text{Absorbância da solução do radical ABTS}} \quad (2)$$

A concentração eficiente ou CE<sub>50%</sub> é definida como a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais ABTS. Construiu-se uma curva exponencial de primeira ordem plotando-se na abscissa as concentrações do óleo essencial e na ordenada a porcentagem de ABTS reduzido.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os rendimentos das extrações foram calculados a partir do volume de óleo essencial obtido em relação à massa do vegetal utilizado. Neste estudo partiu-se de uma massa de 500 g dos rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe sendo obtidos 0,6 mL de óleo. O rendimento massa por volume (m/v) foi de 0,13 %. Na extração do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, utilizou-se 200 g de folhas e obteve-se 0,6 mL de óleo, resultando em um rendimento (m/v) de 0,30 %. Estes resultados estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Rendimento dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação

Material vegetal	Rendimento (% m/v)
<i>Z. officinale</i>	0, 13
<i>R. officinalis</i>	0, 30

A partir dos resultados acima, é possível inferir que o alecrim possuiu maior rendimento que o gengibre. Dabague et al (2013) afirma que o óleo essencial do gengibre que acumula-se nos rizomas apresenta rendimento normalmente inferior ao da maioria das espécies aromáticas.

Em seu estudo, Diemer (2016) obteve um rendimento de 0, 18% na extração do óleo essencial de gengibre através da destilação por arraste a vapor utilizando aparelho Clevenger modificado. Utilizando essa mesma metodologia, Silva et al (2014), encontrou um rendimento de 0, 13%, sendo este valor igual ao obtido neste trabalho. Já Martins (2010), encontrou um rendimento de 0, 37% ao obter o óleo a partir de rizomas frescos por hidrodestilação em um período de quatro horas. Na avaliação das propriedades físico-químicas do óleo essencial de *Z. officinale* por Gomes et al (2016), o rendimento médio alcançado foi de 0,52%. Oliveira et al (2012), ao caracterizar quimicamente os óleos essenciais de espécies medicinais brasileiras para uso na piscicultura, encontraram um rendimento de 0,68% para o óleo essencial de gengibre obtido a partir dos rizomas desidratados.

Enquanto isso, Pereira et al (2007), ao avaliarem a eficiência da extração do óleo essencial de gengibre por diferentes métodos, encontram um valor de rendimento médio de 1,9% em base seca pelo método de arraste a vapor, valor esse muito superior ao alcançado

neste trabalho. No entanto, este resultado compreende a faixa de valores de rendimento referenciados pelos mesmos autores, que oscilam entre 0,2 e 2,7%.

Ao compararem o óleo essencial de alecrim obtido por hidrodestilação e destilação por microondas, Okoh et al (2010) obtiveram rendimentos de 0,31% e 0,39%, respectivamente, sendo estes valores próximos ao encontrado neste pesquisa. Heinke et al (2009), utilizando a extração assistida por microondas, encontraram rendimento de 0,31% a partir da planta fresca, e ainda citam rendimento por arraste à vapor de 0,25% e de 0,59% pelo método de hidrodestilação. Já Probst (2012) e Ribeiro (2011) extraíram o óleo essencial de alecrim por hidrodestilação e obtiveram rendimentos de 0,58% e 1,0%, respectivamente. Serafini et al (2002) reporta que as folhas do alecrim contêm 0,5 a 1,2% de óleo essencial, no entanto Zaouali et al (2010), ao analisarem seis amostras de alecrim, obtiveram rendimentos dos óleos essenciais que variaram entre 1,17% a 2,7%,e, Diemer (2016) alcançou um valor de 1,97% utilizando as folhas secas do alecrim.

De forma geral, os rendimentos de *Zingiber officinale* e *Rosmarinus officinalis* obtidos neste estudo, mostraram-se inferiores àqueles reportados na literatura. No entanto, o rendimento é normalmente afetado por diversos fatores, incluindo a metodologia empregada na obtenção do óleo, o tempo de extração, as partes vegetais utilizadas e fase de desenvolvimento da planta. É importante considerar também, que os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente, por isso, os fatores abióticos podem acarretar alterações na composição e no teor do óleo essencial produzido. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar o clima, luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, características do solo, época e horário de coleta, técnicas de colheita e pós – colheita, entre outros (FERNANDES, 2012; MORAIS, 2009).

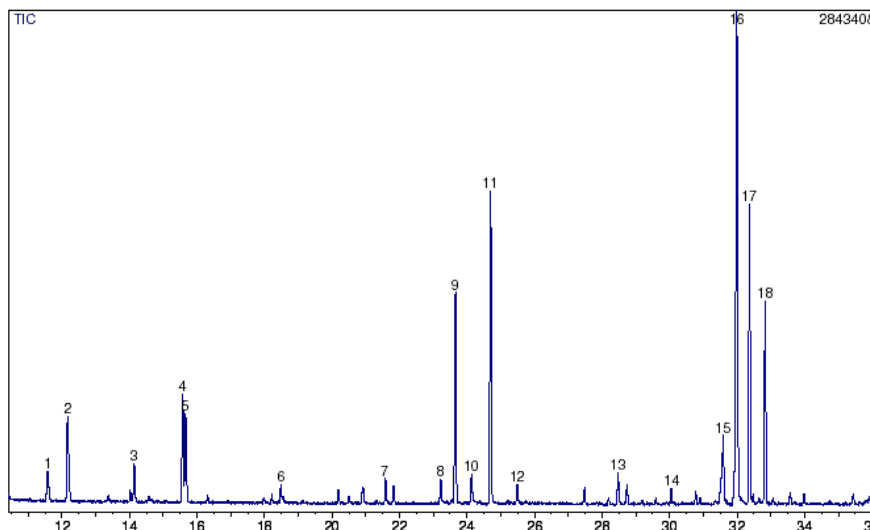
## 5.2 Composição química dos óleos essenciais

Os espectros obtidos na Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas seguidos da comparação com os dados da biblioteca de NIST (2005) e ADAMS (2007), permitiram o conhecimento da composição química dos óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe e *Rosmarinus officinalis* L..

A Figura 15 representa o cromatograma do óleo essencial de gengibre, onde se verifica a presença de 18 sinais entre 11 e 33 minutos de corrida cromatográfica. Na Tabela 2 estão relacionados os componentes encontrados no óleo essencial de gengibre com seus respectivos tempos de retenção, sendo possível inferir que os 18 componentes foram identificados,

atingindo o total de 100% da composição. Os constituintes majoritários foram o  $\alpha$ -zingibereno (27,14%), geranial (14,06%), nerolidol (13,51%), neral (9,64%),  $\beta$ -sesquifelandreno (9,45%), sabineno (5,23%) e canfeno (5,02%).

**Figura15** – Cromatograma do óleo essencial do gengibre



Diemer (2016) conseguiu identificar em seu estudo 12 constituintes no óleo essencial de gengibre que totalizaram 97,10%, sendo o  $\alpha$ -zingibereno (24,20%), geranial (15,71%),  $\beta$ -bisaboleno (12,73%), neral (10,61%),  $\beta$ -sesquifelandreno (10,07%),  $\gamma$ -curcumeno (7,17%) e  $\beta$ -felandreno (6,75%) os compostos majoritários. Esses valores corroboram os resultados obtidos neste trabalho para os componentes majoritários geranial,  $\alpha$ -zingibereno, neral e  $\beta$ -sesquifelandreno, para os demais constituintes, no entanto, foram diferentes.

Koroch et al. (2007) encontraram, ao analisar o óleo essencial de gengibre de uma espécie do Madagascar, 11 componentes que totalizaram 96,6% sendo que os majoritários foram  $\alpha$ -zingibereno (22,9%), geranial (14,6%),  $\beta$ -bisaboleno (8,5%), neral (6,4%),  $\beta$ -sesquifelandreno (6,5%),  $\gamma$ -curcumeno (7,7%) e  $\beta$ -felandreno (0,9%), onde pode-se verificar semelhanças com a composição obtida neste estudo, principalmente em relação ao teor de  $\alpha$ -zingibereno e geranial.

Foram identificados 57 substâncias no óleo essencial de gengibre por Singh et al. (2008), representando cerca de 92,7% do total do óleo, dentre estes o geranial (25,9%),  $\alpha$ -zingibereno (9,5%), (E,E)- $\alpha$ -farneseno (7,6%), neral (7,6%), curcumeno (6,6%),  $\beta$ -sesquifelandreno (5,1%), 1,8-cineol (1,9%) foram identificados como componentes majoritários. De forma semelhante, Soares (2009), ao investigar a atividade biológica do óleo essencial de gengibre sobre o fungo *Aspergillus carbonarius*, encontrou como composto majoritário o geranial

(20,92%), seguido do nerol (14,34%), sabieno (9,08%),  $\alpha$ -zingibereno (8,04%) e 1,8-cineol (7,56%); observa-se também que todos esses constituintes foram encontrados neste estudo, no entanto em concentrações distintas.

**Tabela 2** – Composição química do óleo essencial de gengibre

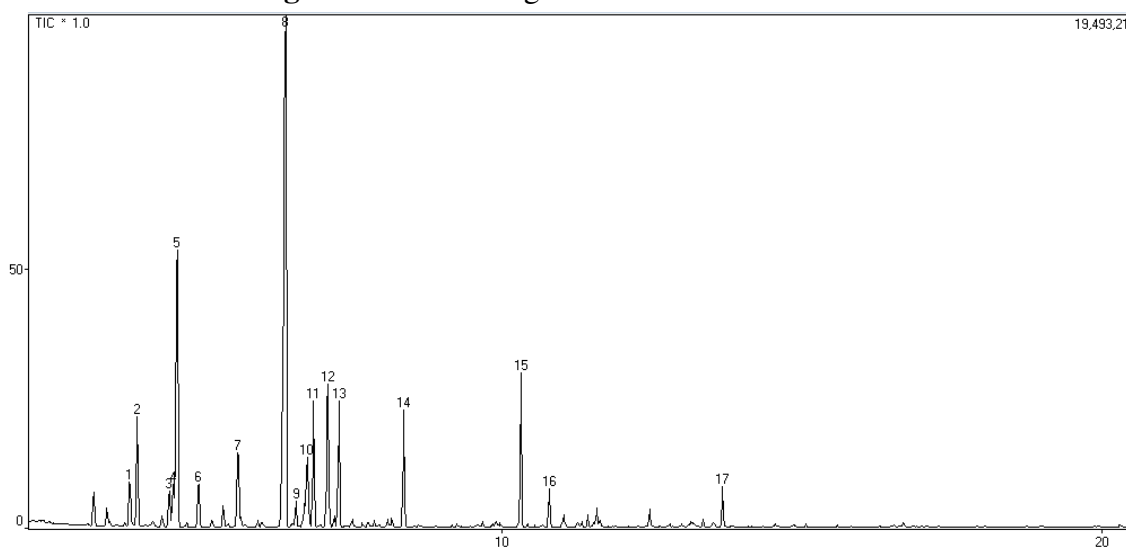
Pico <sup>1</sup>	T <sub>R</sub> <sup>2</sup>	Compostos	%A <sup>3</sup>
1	11,52	$\alpha$ -Pineno	1,46
2	12,17	Canfeno	5,02
3	14,14	$\beta$ -Mirceno	1,29
4	15,76	Sabineno	5,23
5	15,66	1,8-Cineol	4,35
6	18,48	Linalol	0,50
7	21,59	4,4-Dimetil-2-pentinal	0,80
8	23,22	terc-Dodeciltiol	0,71
9	23,65	Neral	9,64
10	24,13	Nerol	1,07
<b>11</b>	<b>24,70</b>	<b>Geranial</b>	<b>14,06</b>
12	25,48	2-Undecanona	0,63
13	28,47	Farnesol	1,27
14	30,05	1,1-Diciclopropiletileno	0,55
15	31,59	ar-Curcumeno	3,33
<b>16</b>	<b>31,99</b>	<b><math>\alpha</math>-Zingibereno</b>	<b>27,14</b>
<b>17</b>	<b>32,37</b>	<b>Nerolidol</b>	<b>13,51</b>
18	32,83	$\beta$ -Sesquifelandreno	9,45

Nota: <sup>1</sup>Número do pico pela ordem de eluição da coluna; <sup>2</sup>T<sub>R</sub>: tempo de retenção dos compostos na coluna cromatográfica em minutos; <sup>3</sup>%A: porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostra.

A partir das composições do óleo essencial de gengibre mencionadas, é possível perceber que o nerolidol não é reportado como um constituinte majoritário, a despeito de nesta pesquisa ter-se obtido uma representativa abundância relativa deste composto. Kamaliroosta et al. (2013) obteve um teor de 2,01% do nerolidol, já Kizhakkayil e Sasikumar (2012), encontraram valores que variaram de 0,71 a 1,74%, enquanto que Sasidharan e Menon (2010) obtiveram 2,9% deste composto, e Kumari et al. (2014) alcançaram 0,32%.

Na Figura 16 pode-se observar o cromatograma do óleo essencial de alecrim, onde se verifica a presença de 17 sinais entre 3 e 14 minutos de corrida cromatográfica. Na Tabela 3 estão relacionados os componentes encontrados no óleo essencial de alecrim com seus respectivos tempos de retenção, sendo possível inferir que os 17 componentes foram identificados, atingindo o total de 100% da composição. Os constituintes majoritários foram a cânfora (37,00%), 1,8-cineol (11, 32%),  $\alpha$ -terpineol (7,12%),  $\beta$ -cariofileno (6, 43%) e verbenona (5,85%).

**Figura16** – Cromatograma do óleo essencial do alecrim



Composição química semelhante ao encontrada neste trabalho foi reportada por Boix et al. (2010), que apontaram, dentre os 23 compostos identificados, a cânfora (33, 17%), 1,8-cineol (14,02%), verbenona (8,6%) e  $\beta$ -pineno (7,0%) como componentes majoritários do óleo essencial de alecrim. Probst (2012) também identificou a cânfora (27,51%) como componente majoritário, sendo seguido do limoneno (21,01%), mirceno (11,19%),  $\alpha$ -pineno (10,37%) e  $\beta$ -pineno (5,27%),  $\beta$ -cariofileno (4,60%), canfeno (3,64%), verbenona (3,0%), borneol (2,10%),  $\gamma$ -terpineno (1,71%), linalol (1,15%),  $\alpha$ -felandreno (0,21%); a partir destes valores, é possível observar similaridade com a composição do óleo essencial deste estudo.

Diemer (2016) conseguiu identificar em seu estudo 18 constituintes que totalizaram 99,67%, sendo 1,8-cineol (40,77%), cânfora (22,27%), borneol (9,73%) e  $\alpha$ -terpineol (5,14%) os componentes majoritários. Já Zaouali et al. (2010), encontraram 25 componentes representando 93,6% do total, onde os majoritários foram 1,8-cineol (40,0%), cânfora (17,9%),  $\alpha$ -pineno (10,3%), e canfeno (6,3%). De forma semelhante, Maia et al. (2014), obtiveram a seguinte composição: 1,8-cineol (44,39%), cânfora (19,75%),  $\alpha$ -pineno (12%) e

$\beta$ -cariofileno (4,53%). Esses resultados corroboram os resultados obtidos neste trabalho para os componentes majoritários (cânfora e 1,8-cineol) e mostram que todos os constituintes mencionados anteriormente foram encontrados neste estudo, no entanto em concentrações distintas.

**Tabela 3** – Composição química do óleo essencial de alecrim

Pico <sup>1</sup>	T <sub>R</sub> <sup>2</sup>	Compostos	%A <sup>3</sup>
1	3,790	$\beta$ -pineno	2,29
2	3,918	$\beta$ -mirceno	4,36
3	4,452	p-cimeno	1,41
4	4,519	Limoneno	2,02
<b>5</b>	<b>4,584</b>	<b>1,8-cineol</b>	<b>11,32</b>
6	4,943	$\gamma$ -terpineno	1,61
7	5,599	Linalol	2,99
<b>8</b>	<b>6,392</b>	<b>Cânfora</b>	<b>37,00</b>
9	6,567	Pinocarvona	2,17
10	6,753	Borneol	3,24
11	6,860	Terpinen-4-ol	4,79
12	7,095	$\alpha$ -terpineol	7,12
13	7,286	Verbenona	5,85
14	8,363	Acetato de bornila	4,28
15	10,315	$\beta$ -cariofileno	6,43
16	10,793	$\alpha$ -humuleno	1,47
17	13,679	$\alpha$ -bisabolol	1,65

Nota: <sup>1</sup>Número do pico pela ordem de eluição da coluna; <sup>2</sup>T<sub>R</sub>: tempo de retenção dos compostos na coluna cromatográfica em minutos; <sup>3</sup>%A: porcentagem da área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos componentes na amostra.

Okoh et al. (2010) identificaram verbenona (17,43%), cânfora (16,57%), 1,8-cineol (11,91%) e  $\alpha$ -pineno (11,47%) como principais componentes. Enquanto isso, Ribeiro (2011) obteve  $\beta$ -mirceno (24,2 %), 1,8-cineol (22,2%),  $\alpha$ -pineno (19,8%) e verbenona (9,3%), correspondendo a 75,5 % do total do óleo.

O óleo essencial de alecrim avaliado por Santoyo et al. (2005) continha em sua composição  $\alpha$ -pineno, 1,8- cineol, cânfora, verbenona e borneol, totalizando cerca de 80%. Este autor atribuiu a propriedade antimicrobiana do óleo a estes compostos, sendo o borneol o mais efetivo. Dentre estes compostos, somente o  $\alpha$ -pineno não foi encontrado nesta pesquisa, e os outros compostos representaram 57,41% da composição, o que pode sugerir que a atividade antimicrobiana do óleo essencial estudado está ligada ao sinergismo entre estes constituintes.

As variações significativas nas composições químicas dos óleos essenciais de alecrim e gengibre podem ter ocorrido devido a fatores abióticos que acarretam modificações significativas na produção do óleo. Apesar da composição química dos óleos essenciais serem determinadas por fatores genéticos, os estímulos ambientais no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Por isso um mesmo quimiotipo pode ter uma diferença significativa de rendimento (MORAIS, 2009).

### 5.3 Atividade antibacteriana

Os resultados do teste de difusão em ágar e a Concentração Inibitória Mínima permitiram a avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de alecrim e gengibre. Na Tabela 4 estão representados os valores do halo de inibição obtidos frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

**Tabela 4** - Halo de inibição dos óleos essenciais de *Z. officinale* e *R. officinalis* encontrada para os microorganismos *E. coli* e *S. aureus*.

Bactéria*	Halo de inibição (mm)	
	<i>Z. officinale</i>	<i>R. officinalis</i>
<i>Escherichia coli</i>	10,7 ± 0,82	9,7 ± 0,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,7 ± 0,94	10,7 ± 2,16

\*As análises foram realizadas em triplicata

Utilizou-se como parâmetro para avaliação da atividade antimicrobiana os padrões de sensibilidade adotados por Carovic'–Stanko et al. (2010) os quais classificaram a atividade de diferentes óleos essenciais de acordo com o tamanho do halo de inibição. É considerado zona fortemente inibitória, halos com diâmetro maior que 15 mm, zona moderadamente inibitória



halos com diâmetro entre 10-15 mm e zona não inibitória halos com diâmetro menor que 10 mm.

De acordo com este parâmetro, o óleo essencial de *Z. officinale* apresentou atividade inibitória moderada frente *Escherichia coli* (10,7 mm) e não inibitória para *Staphylococcus aureus* (9,7 mm), sendo considerada resistente ao antimicrobiano por este teste. Enquanto isso, o óleo essencial *R. officinalis* mostrou atividade inibitória moderada em relação a *S. aureus* (10,7 mm) e não inibitória para *E. coli* (9,7 mm). Considerando que a eficiência do óleo essencial é determinada pelo tamanho da zona de inibição, não foi possível estabelecer qual dos óleos essenciais proporcionou melhor atividade antimicrobiana, pois os halos de inibição em relação àqueles microorganismos sensíveis foram iguais.

Grégio (2006), ao avaliar a ação antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente à microbiota bucal, não obteve halo de inibição para *S. aureus* e *E. coli*, utilizando a técnica de difusão em cilindros. Singh et al (2008), também não observou halos de inibição para estes mesmos microorganismos. Já Trajano et al (2009), obteve halo de 15 mm frente *S. aureus*, no entanto o óleo essencial de gengibre não apresentou efeito inibitório para *E. coli*. Da mesma forma, este mesmo microorganismo não foi sensível ao óleo de gengibre no estudo de Machado (2011) enquanto que, *S. aureus* apresentou halo de 4 mm. Silva et al (2014), pela técnica de difusão em disco, encontrou halos de 9 mm e 17 mm para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. A partir destes resultados, é possível observar que o óleo essencial de *Z. officinale* tem melhor efeito bactericida frente *S. aureus*, quando comparado a *E. coli*, no entanto resultado oposto foi encontrado neste trabalho.

Trajano (2009), ao testar o óleo essencial de alecrim frente contaminantes de alimentos, não encontrou halo de inibição para *S. aureus* e *E. coli*, enquanto isso, Machado (2011), frente esses mesmos microorganismos, obteve halos de 8,3 e 4 mm, respectivamente. Wanderley (2015) encontrou frente cinco cepas de *S. aureus*, valor médio de halo de 10,4 mm, sendo estes resultados próximos aos obtidos nesta pesquisa. Empregando a técnica de difusão em cavidade de ágar modificada, Packer e Luz (2007), alcançaram halo de inibição maior que 10 mm frente *E. coli* e menor que este valor para *S. aureus*. Ribeiro (2011), utilizando o óleo essencial de alecrim pelo método de difusão em disco, obteve halos de 15 a 21 mm frente *E. coli* de diferentes linhagens, e de 18 mm para *S. aureus*. Já Cordeiro (2012), encontrou um halo médio de 2,65 cm frente *S. aureus*, no entanto não observou formação de halo par *E. coli*.

Existem algumas explicações possíveis para as diferenças dos resultados de ação antibacteriana dos óleos essenciais: variações do método utilizado, solubilidade do óleo ou de

seus componentes e as concentrações testadas, microorganismo de referência, concentração das células e condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), características do processo de extração, além das possíveis variações da composição dos óleos essenciais devido aos fatores abióticos.

A técnica de difusão em disco é o método mais utilizado para a avaliação da atividade antibacteriana. No entanto, a vantagem desta técnica é limitada à geração de dados preliminares fornecendo somente dados qualitativos, já que a zona de inibição de crescimento sofre influência da velocidade de difusão do óleo essencial no ágar, devido sua viscosidade e baixa polaridade, em detrimento do caráter hidrofílico do ágar. Além disso, a ausência de uma zona de inibição não significa necessariamente que o óleo essencial seja inativo frente ao microorganismo testado, mas sim que a difusão não foi completa, especialmente para os compostos menos polares que se difundem mais lentamente no meio de cultura (BONA et al., 2014).

Outro problema observado nesta técnica é a difusão irregular dos componentes lipofílicos do óleo, resultando em concentrações desiguais do óleo no ágar, causando a formação de regiões com atividade antimicrobiana variável (NASCIMENTO et al., 2007).

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos pelo método de diluição em meio líquido, onde os óleos essenciais de *Zingiber officinale* Roscoe e *Rosmarinus officinalis* L. apresentaram valores de concentração inibitória mínima para *Escherichia coli* de 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1700  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e, frente *Staphylococcus aureus* de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 1500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 5** - Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *Z. officinale* encontrada para os microorganismos *E. coli* e *S. aureus*.

CIM ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
Bactéria	<i>Z. officinale</i>	<i>R. officinalis</i>	DMSO*
<i>E.coli</i>	1000	1700	NI
<i>S. aureus</i>	200	1500	NI

\*NI: Não ocorreu inibição.

De acordo com os resultados acima, é possível inferir que o óleo essencial de gengibre foi mais efetivo em inibir o crescimento de ambos os microorganismos testados, em detrimento do óleo essencial de alecrim. Como parâmetro de avaliação da atividade antibacteriana dos materiais vegetais pelos valores da CIM, Aligianis et al. (2001) propuseram

a seguinte classificação, sendo forte inibição: MIC até 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; inibição moderada: MIC entre 600 e 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; e fraca inibição: MIC acima de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Assim, o óleo essencial de gengibre apresentou forte inibição frente *S. aureus* e moderada inibição em relação a *E.coli*, e, o óleo essencial de alecrim apresentou fraca inibição para ambos os microorganismos em teste. Esta classificação da ação antimicrobiana está ilustrada na Tabela 6.

**Tabela 6** - Classificação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente *E. coli* e *S. aureus*.

CIM		
Bactéria	<i>Z. officinale</i>	<i>R. officinalis</i>
<i>E.coli</i>	Inibição moderada	Fraca inibição
<i>S. aureus</i>	Forte inibição	Fraca inibição

De forma geral, a linhagem de *S. aureus* utilizada neste trabalho foi mais sensível aos óleos essenciais de gengibre e alecrim, o que novamente confirma relatos da literatura que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos produtos naturais que as Gram-negativas. Segundo Cox et al. (2000), a resistência destas bactérias, como a *E. coli*, está associada a estrutura da parede celular, que é constituída essencialmente de um lipopolissacarídeo que bloqueia a penetração de óleo hidrófobo e evita o acúmulo de óleos essenciais na membrana de células alvo, conferindo uma maior resistência a essas bactérias, por outro lado, os ácidos lipoteicóicos e a extremidade lipofílica da membrana celular da bactéria Gram-positivas podem facilitar a penetração de compostos hidrofóbicos.

Após a realização dos testes microbiológicos, observou-se que os resultados encontrados para o gengibre pelo método de difusão em disco e diluição em meio líquido foram confrontantes, visto que pela primeira técnica o óleo apresentou fraca ação inibitória frente *S. aureus*, e, pela segunda técnica forte ação inibitória. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, como no teste de difusão em ágar a formação do halo é proporcional à difusão dos óleos, esta pode ter sido relativamente baixa, não sendo suficiente para inibir o crescimento do microorganismo. Já no teste de concentração inibitória mínima, o contato entre os óleos e a suspensão bacteriana é maior, proporcionando, segundo Ostrosky et al. (2008), resultados mais confiáveis. Nascimento (2007) ainda afirma que, os métodos de atividade antimicrobiana não são necessariamente comparáveis. O primeiro método

disponibiliza dados qualitativos, enquanto que o segundo mostra ser o que melhor disponibiliza dados quantitativos. Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores intrínsecos aos testes.

Dal Pozzo (2010), ao avaliar a suscetibilidade de *S. aureus* isolado de mastite bovina e caprina, não obteve ação antimicrobiana nas concentrações testadas de 100 a 6400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o óleo essencial de gengibre e alecrim. Estes mesmos óleos foram testados por Santurio et al. (2011) frente 79 amostras de *E. coli* isoladas de fezes de aves e bovinos, porém não foi evidenciada atividade antibacteriana na faixa de concentração testada, que coincide com a do autor anteriormente citado.

Andrade (2010) obteve CIM de 7, 81  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para óleo essencial de gengibre frente *S. aureus*, porém *E. coli* não mostrou-se sensível ao óleo. A baixa CIM frente *S. aureus* obtido por este autor pode estar relacionada com sua composição que apresenta geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geranila (4,19%) como principais componentes, diferindo substancialmente ao encontrado neste estudo.

Diemer (2016), obteve pela técnica de diluição em poços, valores de CIM para *S. aureus* de 1250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 625  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e, de 1250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. coli*, utilizando os óleos essenciais de gengibre e alecrim, respectivamente. No trabalho desse autor, o óleo essencial de alecrim foi o mais efetivo no combate aos microorganismos em teste, o que pode ter ocorrido devido a maior concentração de 1,8-cineol (40,77%) e do borneol (9,73%) se comparado aos teores encontrados neste trabalho. Este último composto, segundo Santoyo et al (2005), é o mais efetivo no óleo essencial de alecrim no combate as bactérias.

Okoh et al (2010) e Probst (2012), avaliando o potencial antimicrobiano do óleo essencial de alecrim obtido por hidrodestilação, obtiveram valores de CIM de 3750  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 8650  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. aureus*, e, 7500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 9170  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. coli*, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho foram bem mais expressivo devido, provavelmente, ao maior teor da cânfora (37,00%) em comparação com aqueles obtidos nos estudos dos autores citados que foram de 17,43% e 27,51%, respectivamente.

Na avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim frente bactérias isoladas de alimentos, Ribeiro (2011), encontrou CIM de 200  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  para diferentes linhagens de *E. coli* e para *S. aureus*. Em sua composição, os componentes majoritários foram o  $\beta$ -mirceno (24,2%) e 1,8-cineol (22,2%), o que não permite relacionar a atividade antimicrobiana unicamente a um componente, sugerindo efeito sinérgico entre os constituintes.

A ação antibacteriana expressiva do óleo essencial de *Zingiber officinale* frente *S. aureus* configura um resultado bastante expressivo, visto que esses microorganismos são descritos como um dos principais agentes responsáveis por infecções, além disso, sua virulência e capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos resultam em um problema sério em todo o mundo para os hospitais e profissionais de saúde. O mecanismo de resistência da *Staphylococcus aureus* está associado a uma ativação da síntese da parede celular, com a produção elevada de seus componentes, reduzindo a quantidade de antibiótico que chega a membrana plasmática (SARAIVA, 2012).

É importante ressaltar que, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* é referenciado na literatura como antimicrobiano natural, ou seja, possui elevado poder inibitório de crescimento de microorganismos e, embora, neste trabalho, não tenha apresentado um resultado significativo na inibição das bactérias testadas, ele pode ter ação inibitória contra fungos, vírus e outras bactérias não testadas.

#### **5.4 Atividade antioxidante**

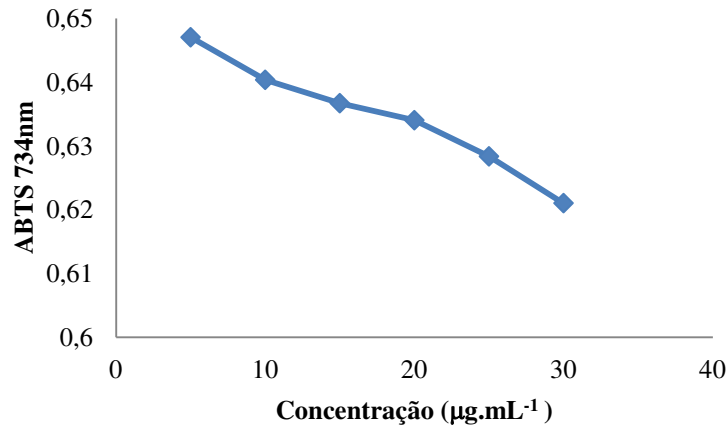
O ABTS é um método operacionalmente simples e é comumente utilizado em muitos estudos de avaliação da capacidade antioxidante de diversos compostos. A capacidade antioxidante é medida pela habilidade que o composto em teste possui em decrescer a cor reagindo diretamente com o radical ABTS<sup>+</sup>.

A avaliação antioxidante neste trabalho foi expressa como a capacidade de sequestrar/reduzir radicais ABTS em porcentagem (%I) e pelo valor de CE<sub>50%</sub> que representa a concentração do óleo essencial ou do extrato hidroalcoólico na qual uma atividade antioxidante de 50% é observada.

A Figura 17 representa o comprimento de onda utilizado para as medidas de absorvância do radical ABTS (734 nm) em função das concentrações do óleo essencial de *Zingiber officinale*. Observa-se que à medida que a concentração do óleo aumenta, a absorvância diminui, ocasionando a redução na intensidade da coloração da solução, comprovando que os radicais estão sendo inibidos.

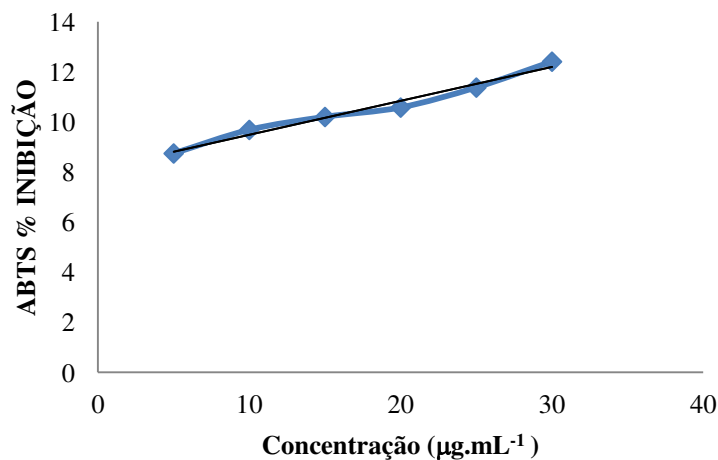
Todavia, verifica-se que a absorvância não reduziu significativamente, o que representa que ainda havia radicais livres na solução para serem estabilizados. Na Figura 18 é representado o percentual de inibição do radical livre ABTS pelo óleo essencial de *Zingiber*

**Figura 17** – Gráfico da concentração do óleo essencial de gengibre *versus* absorvância do radical ABTS



*officinale* nas concentrações de 5 a 30 µg.mL<sup>-1</sup>. A equação da reta obtida foi  $y = 0,1359x + 8,1212$  ( $R^2 = 0,9781$ ), e a partir dela, por meio da regressão linear, calculou-se a concentração efetiva ou CE<sub>50%</sub>.

**Figura 18** - Gráfico da concentração do óleo essencial de gengibre *versus* % de inibição do radical ABTS



O óleo essencial de gengibre conseguiu inibir 12,41% dos radicais ABTS na máxima concentração testada e apresentou de CE<sub>50%</sub> de 308,16 µg.mL<sup>-1</sup>. Melo et al. (2008) definiram que a capacidade antioxidante pode ser considerada forte, intermediária ou fraca quando o percentual de sequestro do radical atingir, respectivamente, valores acima de 70%, entre 60 e 70% e abaixo de 50%. De acordo com estes autores, o óleo essencial de gengibre possuiu fraca capacidade antioxidante na máxima concentração testada.

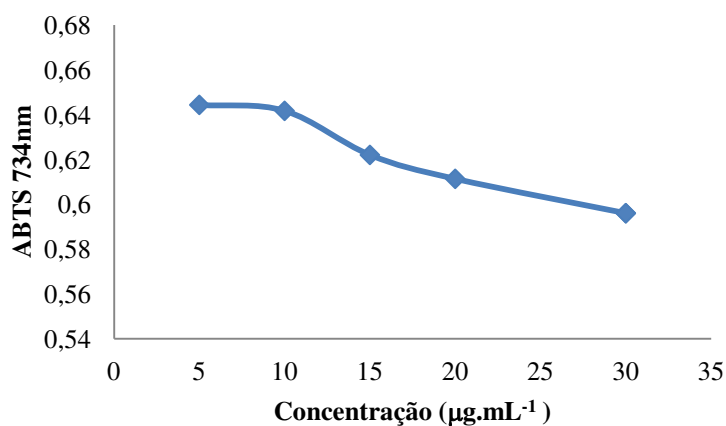
Ao estudar a atividade antioxidante e antiinflamatória do óleo essencial de gengibre, Jeena et al.(2013) obteve valor de CE<sub>50%</sub> maior que 1000 µg.mL<sup>-1</sup> e porcentagem de inibição

inferior a 7%. Estes resultados são bem inferiores ao obtido neste trabalho, e os autores atribuem a este fato a baixa concentração de compostos fenólicos, que são os principais responsáveis pela atividade antioxidante.

Andrade (2010) encontrou valor de  $CE_{50\%}$  para o gengibre pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico obtendo  $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; utilizando o DPPH, não foi observada atividade antioxidante. O autor atribui a atividade antioxidante do óleo aos aldeídos geranial (25,06%) e neral (16,47%), que encontram-se em concentrações bem mais elevadas do que neste trabalho. Além disso, o método  $\beta$ -caroteno/ácido é ideal para compostos lipofílicos como os óleos essenciais.

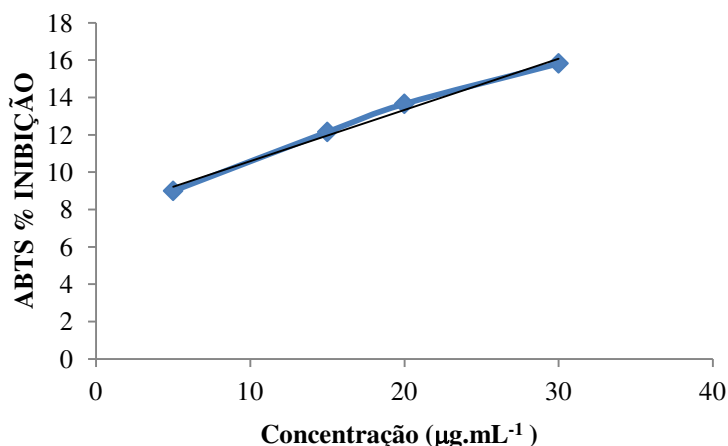
A Figura 19 representa o comprimento de onda utilizado para as medidas de absorvância do radical ABTS (734 nm) em função das concentrações do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. Pode-se observar pelas Figuras 17 e 19 que o radical ABTS ainda não se encontrava estável. Desta forma, se fossem realizadas medidas de absorvância utilizando soluções de concentrações sucessivamente superiores àquelas usadas neste trabalho, o radical continuaria sendo reduzido e sua absorvância diminuiria até que todo radical fosse totalmente consumido (estabilizado).

**Figura19** - Gráfico da concentração do óleo essencial de alecrim *versus* absorvância do radical ABTS



Na Figura 20 é representado o percentual de inibição do radical livre ABTS pelo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* nas concentrações de 5 a  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A equação da reta obtida foi  $y = 0,2742x + 7,8553$  ( $R^2 = 0,9897$ ), e a partir dela, por meio da regressão linear, calculou-se a concentração efetiva ou  $CE_{50\%}$ .

**Figura 20** - Gráfico da concentração do óleo essencial de alecrim *versus* % de inibição do radical ABTS



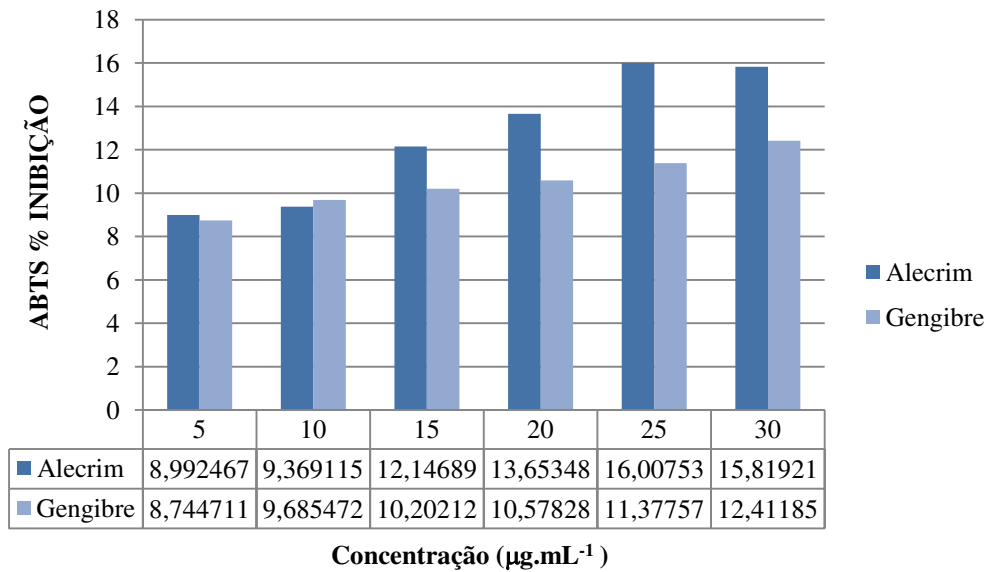
O óleo essencial de alecrim conseguiu inibir 15,8% dos radicais ABTS na máxima concentração testada e apresentou de  $CE_{50\%}$  de 153,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . De acordo com a classificação de Melo et al. (2008), o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* possui fraca capacidade antioxidante. Em relação à concentração eficiente encontrada, Campos et al. (2003) considera o óleo como ativo quando o valor de  $CE_{50\%} < 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Por esse parâmetro, os óleos essenciais de alecrim e gengibre são ativos.

Proestos et al. (2013), ao avaliarem a capacidade antioxidante do óleo essencial de alecrim utilizando o DPPH, obtiveram uma concentração eficiente na faixa de 1000 a 1500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Já Ramos (2014), utilizando a mesma metodologia, obteve, na mínima concentração testada de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $I\% = 21,4$  e  $CE_{50\%}$  de 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Estes valores indicam que o potencial antioxidante dos trabalhos citados anteriormente foram inferiores ao encontrado neste estudo.

Enquanto isso, Wanderley (2015) ao avaliar a atividade antioxidante de *R. officinallis* de cinco campos de cultivos diferentes, encontrou  $CE_{50\%}$  médio de 35,05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor este bem mais expressivo do que o alcançado neste trabalho. Os óleos essenciais obtidos por este autor tiveram como componente majoritário o 1,8-cineol (em média 33,50%), sendo este quimiotipo, segundo Ramos (2014), o principal responsável pela capacidade de estabilização dos radicais livres desta espécie. Desta forma, é possível relacionar o menor potencial antioxidante do óleo essencial de alecrim obtido nessa pesquisa com o baixo teor de 1,8-cineol (11,32%).

Pelos resultados obtidos é possível concluir que, dentre os óleos essenciais estudados, o de alecrim foi o que possuiu melhor capacidade antioxidante. A Figura 21 compara os valores de porcentagem de inibição de ambos os óleos essenciais estudados neste trabalho.



**Figura 21** – Captura do radical livre ABTS pelos óleos essenciais de alecrim e gengibre

Vale ressaltar que, na avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais obtidos de plantas, é difícil se ter uma comparação com outras literaturas, já que a atividade antioxidante pode ser expressa de diversas formas. Outro fator que pode contribuir para essa dificuldade são as modificações introduzidas nas metodologias, tais como os volumes adicionados das soluções do extrato e/ou de radicais livres (SILVEIRA, 2012; VANZ, 2013).

## 6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais obtidos de plantas de uso medicinal e condimentar têm despertado interesse devido suas inúmeras atividades biológicas, destacando-se sua ação antimicrobiana e capacidade como agentes antioxidantes. Dessa forma, estudos e ensaios microbiológicos devem ser levados a termo, cada vez que surge uma fonte terapêutica.

A partir dos resultados obtidos no estudo, infere-se que foi possível identificar os constituintes majoritários do óleo essencial de gengibre ( $\alpha$ -zingibereno, geranial e nerolidol) e do alecrim (cânfora e 1,8 – cineol).

Nas concentrações testadas, o óleo essencial de alecrim não foi eficaz na inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Todavia, o óleo essencial de gengibre apresentou efeito bactericida frente *S. aureus*; este é um resultado bastante expressivo, uma vez que esse microorganismo é descrito como um dos principais agentes responsáveis por infecções, além de possuir capacidade de adquirir resistência aos antimicrobianos.

A partir da avaliação da capacidade antioxidante, verificou-se que o óleo essencial de alecrim foi mais eficiente na estabilização do radical ABTS do que o do gengibre. Ambos os óleos possuíram fraca capacidade antioxidante, no entanto foram considerados como compostos ativos, o que sugere que os óleos essenciais possuem potencial antioxidante e devem ser alvo de pesquisas para aplicação em sistema *in vivo* e em alimentos.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington, USA, Editora ASM Press, 454p., 2005.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, **Allured Publishing Corporation**. London, p. 804, 2007.
- ALIGIANIS, N. et al.. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem**, v.49, p. 4168-4170, 2001.
- ALVES, H. de M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v.3, p. 10-15, maio, 2001.
- ANDRADE, M.A. **Óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antibacteriana**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010. 101p.
- ANGIONE, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **J. Agric. Food Chemical**., v. 52, n. 11, p. 3530-3535, 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOAMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n.2, p.446-475, Feb. 2008.
- BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623p.
- BANIA, J.; DABROWSKA, A.; KORZEKWA, K; ZARCZYNSKA, A.; BYSTRON, J.; CHRZANOWSKA, J.; MOLENDNA, J. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.42, n.4, p.315-320, 2006.
- BAUER, A.K.; WYER-NIELD, L.D.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant C57BL/6 mice. **Toxicology**, Limerick, v.169, n.1, p.1-15, 2001.
- BOIX, Y. F.; VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; KUSTER, R. M. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, 2010.

BONA, E.A.M.; PINTO, F.G.S.; FRUET, T.K.; JORGE, T.C.M.; MOURAS, A.C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 23. Aprova “Regulamento Técnico que aprova uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 fev. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde -- SVS. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2010.

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

CALVACANTE, M.A. **Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Belém, Pará, 2011. 96p.

CAMARGO, L. C. S. **Efeito antiinflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos**. 2006. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

CAMPOS, M. G. et al. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p.742-745, 2003.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.. The potential of *Origanum Vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 362-367. 2008.

CAROVIC'-STANKO, Klaudija; ORLIC', Sandi; POLITEO, Oliveira; STRIKIC', Frane; KOLAK, Ivan; MILOS, Mladen; SATOVIC, Zlatko. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**. v. 119, p. 196-210. 2010.

CARVALHO, A. C. de F. B. De;; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella spp.* em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.

CASSETTARI, V.C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E.A.S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.9, n.1, p.70-76, Feb. 2005.

CASTANHEIRA, B.A.M.G. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades Tecnológicas, Lisboa, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M02-A10. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Wayne, PA, USA, 2009.

CORDEIRO, T.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Sálvia (*Salvia officinalis*) para aplicação em alimentos**. Trabalho de conclusão de estágio (Curso de Tecnologia de Alimentos). Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2012. 13p.

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

DABAGUE, I.C.M.; DESCHAMPS, C.; MACHADO, M.P.; CÔCCO, L.C. **Rendimento do óleo essencial de *Zingiber officinale* em resposta a diferentes processamentos e tempos de extração**. Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient., Curitiba, v. 11, Supl. 2, p. S163-S168, 2013.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, 22: 39-44, 2003.

DAL POZZO, M. **Mastite bovina e caprina: suscetibilidade de isolados de *Staphylococcus spp.* frente aos óleos essenciais extraídos de condimentos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010. 70p.

DI PASQUA, R et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced. **Journal Agricultural Food Chemistry**, London, v. 54, n.7, p. 2745-2749, 2006.

DIEMER, A.W. **Ação antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* e *Zingiber officinale* frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em carne mecanicamente separada de frango**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Centro Universitário Univates, Lajeado, Rio Grande do Sul, 2016. 67p.

ELPO, E.R.S.E.; NEGRELLE, R.R.B. Cadeia produtiva do Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade. **Scientia Agrária**, Curitiba, v.7, n. ½, p.121-122, jan/dez. 2006.

EMBRAPA, **Plantas Medicinais**. Folder 12, Porto Velho, 2001.

FABROWSKI, F.J.R.T. **Eucalyptus smithii R.T. Baker (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil.** Tese (Doutorado em Ciências Florestais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2002.248p.

FARIA, L. R. D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis L.* (alecrim) – atividades anti-inflamatória e analgésica.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade José do Rosário Vellano/UNIFENAS, Alfenas – MG, 2005.

FERNANDES, V. F.; **Crescimento, produção do óleo essencial e anatomia foliar de *Ocimum gratissimum L.* (Lamiaceae) em diferentes níveis de radiação luminosa.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2012. 78p.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I.; MACCHIA, M.; CECCARINI, L. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis L.* and chemical composition of their essential oils. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 12, p. 3512-3517, 2002.

GOMES, P.R.B.; SILVA, A.L.S.; MOUCHREK, V.E.; MOUCHREK, A.N.; EVERTON, P.C. **Avaliação físico-química do óleo essencial *Zingiber officinale Roscoe* (Gengibre).** Revista Cubana de Farmacia, v.50, n.2, 2016.

GRANATO, P.C. **Aspectos sobre resistência bacteriana à tetraciclina (Revisão de literatura).** Monografia (Curso de Medicina Veterinária). Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, Distrito Federal, 2011. 59p.

HEINKE, T.I.; SANTOS, A.C.A. dos.; TOSS, D. Extração do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* utilizando a extração assistida por microondas. **V Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais.** 2009.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR F.; CHATHAI S.A.S.; JABBAR, A.; MAHBOOBIII S.; NIGAM, P.S. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Braz J Microbiol.** 2010; 41(4):1070-8.

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

JEENA, K.; LIJU, V.B.; KUTTAN, R. Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of essential oil from ginger. **Indian J Physiol Pharmacol**, 57(1):51-62, 2013.

JOLAD, S.D. Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): composes and effects on LPS-stimulated PGE2 production. **Phytochemistry**, v.66, p.1614-35, 2005.

KAMALIROOSTA, Z.; KAMALIROOSTA, L.; ELHAMIRAD, A.H. Isolation and identification of ginger essential oil. **J Food Biosciences and Technology**, 3, 73-80, 2013.

KIZHAKKAYIL, J.; SASIKUMAR, B. Characterization of zinger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm based on volatile and non-volatile components. **Afr. J. Biotechnol**, 11(4), 777-786, 2012.

KNEZEVIC, P., OLGA PETROVIC, O. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.31, p.360–363, 2008.

KOROCH, A.; RANARIVELO, L.; BEHRA, O.; JULIANI, H. R.; SIMON, J. E. Quality Attributes of Ginger and Cinamon Essential Oils from Madagascar. **Botanical and Medicinals**. Janick and A Whipkey ed. ASHS Press, Alexandria, 2007.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n.1, p.107, 71, Jan. 2000.

KUMARI, J.; VENKATESHWARLU, G.; CHOUSKE, M.K.; ANANDAN, R. Effect of essential oil and aqueous extract of ginger (*Zingiber officinale*) on oxidative stability of fish oil-in-water emulsion. **J Food Process. Technol**, 6:412, 2014.

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

LIMA, A.P.L.; GROSSO, E.S.B.; FERREIRA, G.; ANDRADE, M.C. Efeito antimicrobiano do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um Hospital Escola do Sul de Minas. **Revista Ciências em Saúde**, v.4, n.2, 2014.

MACHADO, B.F.M.T. **Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a microbiota da pele humana**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Botucatu, São Paulo, 2011. 113p.

MAIA, A.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FARIA, C.M.D.R.; OLIVEIRA, J.S.B.; JARDINETTI, V.A.; BATISTA, B.N. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução e resistência em videira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 49, n. 5, p.330-339, 2014

MARTINS, A.G.L.A. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, 2010. 110p.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A.; DAVIES, M.J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, London, v.84, n.4, p.407-412, 1993.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n.5, p.1655-1666, 2009.

MORAIS, L.A.S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. V. 27, n. 2: S4050- S4063, agosto 2009.

MURRAY, P. R. BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C. YOLKEN, R. H. M. **Manual of Clinical Microbiology**, 8<sup>a</sup> ed. American Society for Microbiology: Washington, 2003.

MORAIS, L.A.S. 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. V. 27, n. 2: S4050- S4063, agosto 2009.

MOREIRA, M.R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, v.38, p.565-70, 2005.

MOTA, L.M.; VILAR, F.C.; DIAS, L.B.A.; NUNES, T.F.; MORIGUTI, J.C. **Uso racional de antimicrobianos**. Medicina (Ribeirão Preto) 2010;43(2):164-72.

NAPOLI, E. M. G.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening of the essential oil composition of wild *Sicilian rosemary*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 38, p. 659-670, 2010.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. A.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, PA,USA, 2003.

NIST (National Institute of Standards and Technology). **Mass Spectral Library**. The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, USA, 2005.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*. 120:308-312, 2010.

OLIVEIRA, S.R.N.; CHAGAS, E.C.; CHAVES, F.C.M.; OLIVEIRA, M.R.; BIZZO, H.R. Obtenção e caracterização química de óleos essenciais de espécies medicinais brasileiras ou adaptadas para uso na piscicultura. **Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônica Ocidental**. Embrapa. Brasília, Distrito Federal, p.205-218, 2013.



OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANECO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.18, n.2, 2008.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S.da. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1): 102-107, 2007.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J.C.; CÂMARA, J.S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, v.105, p.204-214, 2007.

PENTEADO, J.G. CECY, A.T. **Alecrim *Rosmarinus officinalis* L. Labiatae (Lamiaceae): Uma revisão bibliográfica.** Centro Universitário Euro-americana, 2008.

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

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

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

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

POZZATTI, P.; MÜLLER, L.G.; SPADER, T.B.; ALVES, S.H. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de condimentos. *Saúde*, Santa Maria, vol. 32, n. 1, p. 53-58, 2006.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico.** Dissertação (Mestrado em Biomoléculas- Estrutura e função). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, São Paulo, 2012. 112p.

PROESTOS, C.; LYTOUDI, K.; MAVROMELANIDOU, O.K.; ZOUMPOULAKIS. P.; SINANOGLU, V.J. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, v. 2, p. 11-22, 2013.

RAMOS, R. da S. Estudo fitoquímico e da atividade microbiológica, de citotoxicidade e larvicida dos óleos essenciais das espécies da família Lamiaceae (Lamiales). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2014. 88f.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extrato de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2011. 114p.

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.

REGITANO-D’ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO-D’ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Barueri:Monole, 2006. cap.6. p.243-299.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology.** 2nd ed. New York:Marcel Dekker, 2002. p.507-534.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 3rd ed., Nova York: CRC Press, 2008. Chap. 15, p.409-434.

RIBEIRO, D.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos *in vitro* e em matriz alimentícia.** Mestrado (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2011. 102p.

ROZMAN, T.; B. JERSÈK. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of Listeria. **Acta Agricultura Slovenica**, 93(1): 51-58, 2009.

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

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS<sup>o+</sup>. **Embrapa Agroindústria Tropical.** Comunicado técnico, 128. Fortaleza, Ceará, 2007. 4p.

SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 4, p. 790-795, 2005

SANTURIO, D.F.; COSTA, M.M.da.; MABONI, G.; CAVALHEIRO, C.P.; SÁ, M.F.de.; DAL POZZO, M.; ALVES, S.H.; FRIES, L.L.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011.

SANTOS, D.A. **O papel do manipulador de alimentos em surtos de intoxicação alimentar causados por espécies de Staphylococcus ocorridos em quatro cidades do Estado de Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003. 85p.

SARAIVA, R. M. C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente á bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará. Belém – PA, 2012.

SASIDHARAN, I.; MENON, A.N. Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh & dry ginger oils (*Zingiber officinale* Roscoe). **Int J Curr Pharm Res**, 2:4, 40-43, 2010.

SERAFINI, L. A. et al. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: Educ, 2002. 54 p.

SHIMANO, M.Y.H. **Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2012. 110p.

SHUKLA, Y.; SINGH, M. Cancer preventive properties of ginger: a brief review. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.683-90, 2007.

SICHERI, A.P.M.P. **Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo, 2013. 126p.

SIENKIEWICZ, M. et al. Antibacterial and immunostimulatory effect of essential oils. **Int Rev Allergol Clin Immunol**, v. 17, p. 40-44, 2011.

SILVA, A. A. da.; BERGAMO, L.; CAMARGO, L P. de.; FERNANDES, C.; MUSSATO, D.; CANAZART, D.; FILHO, B. A. de A. Atividade microbiológica de óleos essenciais obtidos por arraste a vapor. **Revista UNINGÁ**. Vol.20, n.3, p.33-39, 2014.

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 frescal. **Programa de graduação em Ciência dos Alimentos**. UFSC, Florianópolis, 2012.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: Ed. UFRGS: 2004, p 821.

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

SOARES, R.P. **Atividade biológica dos óleos essenciais de gengibre, açafão e louro sobre o fungo *Aspergillus carbonarius***. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009. 79p.

SOUSA, W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013. 37p.

TAKEMOTO, E.; FILHO, J.T.; GODOY, H.T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.5, p.1189-1194, 2009.

TAVEIRA, N.; OLIVEIRA, A.; GOMES, O.; NASCIMENTO, T. **Manual prático de microbiologia**. Instituto Superior de Ciências da Saúde, 2008.

TIVERON, A.P.; **Atividade Antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.103p.

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

TRAJANO, V.N.; LIMA, E. de O.; SOUZA, E.L. de.; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(3): 542-545, jul.-set. 2009.

VANZ, A. **Avaliação do potencial antioxidante de extrato de alecrim na preservação de filés de Tilápia do Nilo defumados**. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

WANASUNDARA, P.K..P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: science, technology, and applications. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Bailey’s Industrial Oil and Fat Products**. 6 th Ed. John Wiley, 2005. 6v. 463p.

WANDERLEY, A.L. Atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., cultivado em sistema orgânico sob diferentes condições, frente a bactérias causadoras de mastite bovina. Dissertação (Mestrado em em Agronomia). Universidade de Brasília, 2015. 55f.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**. v.48, p. 3144–3152, 2010.