

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

ALEX JÚNIOR BACHI

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM ENSAIOS *IN VITRO***

DOIS VIZINHOS

2017

ALEX JÚNIOR BACHI

**AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SUA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE EM ENSAIOS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial para obtenção do título de biólogo.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa.

DOIS VIZINHOS

2017

B118a Bachi, Alex Júnior.
Avaliação antimicrobiana de óleos essenciais e sua capacidade antioxidante em ensaios *in vitro* / Alex Júnior Bachi – Dois Vizinhos, 2017.
46f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Busso
Coorientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura, Dois Vizinhos, 2017
Bibliografia p. 43-46

1.Essências e óleos essenciais 2. Agentes anti-infecciosos 3. Antioxidantes I. Busso, Cleverson, orient. II. Sousa, Fernando Carlos de, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos IV.Título

CDD: 661.806

ANEXO



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Coordenação do Curso Ciências Biológicas



TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso nº

**Avaliação antimicrobiana de óleos essenciais e sua capacidade antioxidante
em ensaio *in vitro*.**

por

Alex Júnior Bachi

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 16:30 horas do dia 23/06/2017, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho_____.

(aprovado ou reprovado)

Profa. Dra. Marcela Tostes Frata
UTPFR – Dois Vizinhos

Prof. Dr. Cleverson Busso
Orientador
UTFPR – Dois Vizinhos

Profa. Dra. Adriana S. di Domenico
UTFPR – Dois Vizinhos

Elton Celton de Oliveira
Coordenador do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR – Dois Vizinhos

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter colocado ao meu lado as pessoas certas para me auxiliarem no processo de aprendizagem formal o que me permitiu chegar até aqui. À minha família por toda a dedicação e paciência, sem a qual o caminho trilhado seria mais sinuoso e certamente haveriam maiores obstáculos, em especial agradeço ao meu avô, Divaldino, *in memoriam*, pessoa simples de sabedoria imensurável, hoje posso dizer que entendo muito seus conselhos e sem dúvidas foram importantes.

Aos docentes do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, particularmente ao professor Dr. Cleverson Busso, orientador deste trabalho, pelos seus conhecimentos compartilhados, pela paciência, preocupação, atenção e boa vontade, pelos conselhos, pelas oportunidades a mim confiadas durante os quatro anos de graduação.

À Professora Dra. Marcela Tostes Frata, coordenadora do laboratório de Microbiologia, por confiar e disponibilizar os equipamentos para a realização da pesquisa, pelo tempo dedicado aos ensinamentos durante o período que atuei como monitor.

Ao professor Dr. Sérgio Miguel Mazaro por ter cedido os óleos essenciais utilizados neste experimento, bem como o resultado das análises cromatográficas da composição química dos óleos.

À professora Dra. Paula Fernandes Montanher pelas análises da atividade antioxidante dos óleos essenciais.

À professora Dra. Fernanda Ferrari, professora Dra. Adriana Sbardelotto Di Domênico e as minhas colegas de graduação, Indianara, Karine e Fernanda, pelas cobranças e amizade.

RESUMO

BACHI, Alex. **Avaliação antimicrobiana de óleos essenciais e sua capacidade antioxidante em ensaios *in vitro***. 2017. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciência Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

Estudos científicos têm revelado o potencial risco à saúde humana associados ao excessivo uso de antibióticos, aditivos conservantes e agrotóxicos. O uso indiscriminado de antibióticos favorece o surgimento de microrganismos resistentes a esses medicamentos. Os aditivos conservantes se ingeridos em quantidades elevadas podem gerar efeitos citotóxicos. Os estudos referentes aos agrotóxicos geram grandes discussões, ao revelar a capacidade mutagênica, carcinogênica e teratogênica. Os óleos essenciais de plantas têm sido utilizados como alternativa ao uso de antibióticos, sobretudo, pela facilidade de serem encontrados e extraídos. Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar *in vitro* se os compostos presentes nas plantas de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Pogostemon cablin* (patchouli), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Melaleuca anternifolia* Cheel (melaleuca), *Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga) e *Lavandula angustifolia* Miller (lavanda) possuem atividade antibacteriana e também antioxidante. Os óleos essenciais foram obtidos a partir das folhas destas plantas pelo processo de hidrodestilação e a composição foi determinada utilizando-se um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas. O potencial antibacteriano do óleo foi estabelecido através do método de microdiluição em placas para determinação das Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). O efeito sobre a curva de crescimento bacteriano, foi realizado através de bioensaio em caldo Mueller Hinton, com concentrações iniciais dos óleos equivalentes a CIM, as concentrações de bactérias foram determinadas e ajustadas em espectrofotômetro em uma absorbância 0,08 com D.O₆₂₅ $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, em triplicatas. A concentração bacteriana foi medida em tempo 0, 2, 4, 6, 8 e 12 horas utilizando-se para teste as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*. A ação antioxidante foi avaliada pela capacidade do óleo em sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Foram identificados 53 diferentes compostos nos óleos testados, sendo os principais 1,8-cineol 72,31%, β-citronelal 34,15% e pachoulol 21,99%, apenas três compostos, 1,8-cineol, σ-amorfenol e o γ-moruleno, foram identificados em mais que um óleo. No que se refere ao efeito antibacteriano, o óleo essencial de pitanga apresentou melhor atividade inibitória para a cepa *E. coli* com CIM de 1,49 mg mL⁻¹, o óleo de melaleuca registrou melhor atividade bactericida com CBM de 5,67 mg mL⁻¹. O óleo de pitanga sobre a bactéria *S. enterica*, com valores de CIM 2,98 mg mL⁻¹ e CBM 5,98 mg mL⁻¹, para a cepa d *S. aureus* o óleo de citronela foi mais efetivo com 2,63 mg mL⁻¹ de CIM e 5,27 mg mL⁻¹ de CBM, resultados semelhantes foram obtidos nos gráficos de curva de crescimento. O óleo essencial de citronela apresentou o resultado de 660,48 μmol TE mL⁻¹ e o óleo de melaleuca não registrou atividade antioxidante. Os resultados obtidos apontam para o potencial de uso dos óleos essenciais em produtos com propriedades antioxidantes, bem como, coadjuvantes de antibióticos.

Palavras-chave: Antibióticos. Atividade antibacteriana. Óleos essenciais. Microrganismos. Potencial antioxidante.

ABSTRACT

BACHI, Alex. **Antimicrobial evaluation of essential oils and their antioxidant capacity *in vitro* assays.** 2017. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciência Biológicas – Licenciatura), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

Scientific studies have revealed the potential human health risks associated with excessive use of antibiotics, preservative additives and pesticides. The indiscriminate use of antibiotics favors the emergence of resistant microorganism to these drugs. Conservative additives if ingested in high amounts may be cytotoxic. The studies concerning the agrotoxics generate an infinite discussion, revealing the mutagenic, carcinogenic and teratogenic capacity. The essential oils of plants has been used as an alternative to the use of antibiotics, mainly, by the facility of being found and extracted. In this sense, the objective of this work is to evaluate *in vitro* if the compounds present in *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Pogostemon cablin* (patchouli), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Melaleuca anternifolia* Cheel (melaleuca), *Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga) e *Lavandula angustifolia* Miller (lavanda) have antibacterial, antioxidant activities. The essential oils were obtained from the leaves of this plants by the process of hydrodistillation and the composition was determinate utilizing a Gas-chromatograph coupled to a Mass spectrometer. The antibacterial potential of the oils were established through of the microdilution method in plates to determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM). The effect on the bacterial growth curve was carried out by means of a Mueller Hinton broth bioassay with concentration initial of the equivalents oils the MIC, the concentrations of bacterial were determinate and adjusted in spectrophotometer in absorbance 0.08 with D.O₆₂₅ of 1.5×10^8 CFU mL⁻¹, in triplicates the bacterial concentration was measured in time 0, 2, 4, 8 and 12 hours. The antioxidant action was evaluated by the ability of the oil to sequester the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). A total of 53 different compounds were identified in the tested oils, with 1,8-cineol being 72,31%, β -citronellal 34,15% and pacholol 21,99%. Only three compounds, 1,8-cineole, σ -amorphene and γ -morulene, were identified in more than one oil. As regards by antibacterial effect, the pitanga essential oil presented better inhibitory activity for the *E. coli* with MIC of 1,49 mg mL⁻¹, melaleuca oil had better bactericidal activity with CBM of 5,67 mg mL⁻¹. The pitanga oil in the *S. enterica* bacterium, with MIC values 2,98 mg mL⁻¹ and MBC 5,98 mg mL⁻¹, for *S. aureus* citronella oil was more effective with 2,63 mg mL⁻¹ MIC and 5,27 mg mL⁻¹ MBC, similar results were obtained on growth curve graphs. The essential oil of citronella presented the best result 660,48 μ mol TE mL⁻¹, and the oil of melaleuca did not record oxidant activity. The results obtained point to the potential use of essential oils in products with antioxidant properties, as well as antibiotic adjuvants.

Key-Words: Antibiotic. Antibacterial activity. Essential oils. Microorganisms. Potential antioxidants.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Curva de crescimento da bactéria *Escherichia coli*, com os tratamentos dos óleos em de pitanga, citrolena, melaleuca, guaçatonga, patchouli, e lavanda, em concentrações determinada no teste de CIM..... 32
- Gráfico 2 – Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, com os tratamentos dos óleos em de pitanga, citrolena, melaleuca, guaçatonga, patchouli, e lavanda, em concentrações determinada no teste de CIM..... 33
- Gráfico 3 – Curva de crescimento da bactéria *Salmonella enterica*, com os tratamentos dos óleos em de pitanga, citrolena, melaleuca, guaçatonga, patchouli, e lavanda, em concentrações determinada no teste de CIM..... 34
- Gráfico 4 –Atividade antioxidante dos óleos essências testados através do método de sequestro de radicais DPPH expresso $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$ 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg mL^{-1} dos óleos essenciais. Como controle foi utilizado o antibiótico Amoxicilina. 30
- Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de *Eugenia uniflora* (Pitanga), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS..... 36
- Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS. 37
- Tabela 4 - Composição química do óleo essencial de *Melaleuca anternifolia* Cheel (Melaleuca), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS..... 37
- Tabela 5 - Composição química do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Swartz (Guaçatonga), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS. 37
- Tabela 6 - Composição química do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Patchouli), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS..... 38
- Tabela 7 - Composição química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Miller(Lavanda), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS. 39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO LITERÁRIA	14
2.1 Metabolismo secundário de plantas	14
2.2 Óleos Essenciais (OEs)	16
2.2.1 Ação antimicrobiana de OEs	18
2.2.2 Atividade antioxidante de OEs	19
2.3 Bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos sintéticos	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Obtenção dos óleos essenciais	24
4.2 Microrganismos	24
4.3 Preparo do Meio de Cultivo	24
4.4 Preparo do Pré inóculo	25
4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	25
4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	26
4.7 Determinação dos compostos dos óleos essenciais	27
4.8 Determinação da atividade antioxidante	27
4.9 Curva de Crescimento Bacteriano	28
4.9.1 Pré-inóculo	28
4.9.2 Padronização das concentrações do inóculo	28
4.9.3 Ensaio Bacteriano	28
4.10 Análise Estatística	29
4.10.1 Atividade Atimicrobiana	29
4.10.2 Curva de Crescimento Bacteriano	29
4.10.3 Atividade Antioxidante	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 Atividade Antimicrobiana dos óleos essenciais	30
5.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais	34
5.3 Composição dos Óleos Essenciais	35
6 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o estabelecimento da civilização esteve vinculado à utilização dos recursos naturais, em favor, de suplantarem as necessidades mínimas de sobrevivência para garantir alimento, vestes, abrigos e a cura para doenças (GURIB-FAKIM, 2006). O desenvolvimento da ciência e tecnologia, iniciado no final do século XIX, beneficiou o aumento de estudos relacionados às aplicações dos produtos disponíveis na natureza (SALOMON; SAGASTI; SACHS-JEANET, 1993, SILVEIRA; BAZZO, 2009).

Ao alcançar a reprodutibilidade em laboratório e a produção em larga escala, os produtos sintéticos, condicionaram a substituição gradual do produto natural alavancando as indústrias química, farmacêutica e alimentícia (PIMENTEL et al., 2013). A indústria química desenvolveu os agrotóxicos, amplamente utilizados no controle de pragas agrícolas, a indústria farmacêutica com a produção de medicamentos, principalmente os antibióticos sintéticos e a indústria alimentícia, na conservação dos alimentos com os químicos artificiais (WEDIG, 2009).

O setor agrícola, devido à crescente demanda mundial de alimentos, buscava maneiras para aumentar a eficiência produtiva da terra (WEDIG, 2009). Incentivados pela indústria química, com a oferta dos agroquímicos, à adesão e utilização desses produtos promoveram uma transformação no tratamento de pragas agrícolas, aliados à alta eficiência e o baixo custo, ainda assim, os estudos associados aos efeitos da inserção desses agrotóxicos nos diferentes ecossistemas não evoluíram como a linha de produção, antes da comercialização não havia grande conhecimento sobre seus efeitos, logo, as consequências foram surgindo no decorrer das décadas seguintes (SOARES, 2010).

Com a publicação do livro *Spring Silent*, em 1962, Rachel Carson, revela os primeiros malefícios associados à ingestão de produtos tratados com agrotóxicos, tais como o aumento da possibilidade de desenvolver doenças crônicas como o câncer e as alterações genéticas irreversíveis. Estas revelações foram abertas ao mundo, conduzindo a novos estudos, que constataram o potencial nocivo dos agroquímicos.

A descoberta dos microrganismos e sua relação com doenças infecciosas, também ocorreu no século XIX, foi após essa descoberta, que pesquisadores puderam aprimorar procedimentos preventivos e terapêuticos contra doenças (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Na maior parte do tempo, seres humanos e microrganismos coexistem pacificamente, controlados pelo sistema imunológico. A manifestação da doença ocorre quando

o sistema de defesa é comprometido, ou quando não suporta a concentração de determinado patógeno (SANTOS, 2004). Diversos grupos de seres vivos são capazes de gerar doenças infecciosas, as bactérias e os fungos são dois grupos de microrganismos que apresentam maior capacidade de causar doenças infecciosas (PAUW, 2011).

Na primeira metade do século XX, com o advento da corrida armamentista, a indústria farmacêutica passa a oferecer os antimicrobianos, esses fármacos revolucionaram o tratamento de doenças infecciosas, todavia, a introdução dos antimicrobianos no tratamento terapêutico, evidenciou que os microrganismos podem apresentar resistência aos antimicrobianos de maneira natural ou adquirida (PERSIDIS, 1999). A resistência adquirida é resultado da alta capacidade que as bactérias apresentam de responder a alterações ambientais (SANTOS, 2004). Os organismos resistentes possuem mecanismos que tornam os tratamentos tradicionais ineficazes (SANDE-BRUINSMA et al., 2008). A continuidade das infecções ocasiona o aumento do risco de óbito do paciente e as chances de disseminação da doença (PERSIDIS, 1999, ARABESTANI; KARAMI; ALIKANI, 2014).

No Brasil, em decorrência de suas condições climáticas e geográficas, as doenças relacionadas a agentes etiológicos microbianos ocorrem com maior frequência. Devido a essa peculiaridade as infecções bacterianas e fúngicas recebem posição de destaque, à medida que, esses processos infecciosos, podem nos casos mais simples, provocar lesões no epitélio de revestimento, como pele, mucosas oral e genital, trato respiratório e em casos mais graves, ocasionam septicemia, endocardite, meningites e o óbito. As principais espécies causadoras desse tipo de doenças, geralmente, pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* e *Rhizopus* (ARAÚJO et al. 2004).

Em 2014 a Organização Mundial da Saúde, do inglês World Health Organization (WHO) publicou em seu relatório estimativas de custos relacionados ao tratamento de casos de resistência bacteriana a antibióticos, no sistema de saúde norte-americano supera os 20 bilhões de dólares, o relatório deixa claro, que o crescente número de casos de resistência bacteriana é um problema de saúde pública mundial e é indispensável o desenvolvimento de alternativas para o tratamento dessas doenças.

A indústria alimentícia apresentou grande crescimento no último século, devido à globalização, a população dispõe de menos tempo para o preparo de alimentos, logo, os processos de industrialização permitiram o aumento do tempo de armazenagem de alimentos através dos aditivos químicos (CONTE, 2016). O uso de produtos químicos para manutenção das características dos alimentos, a fim de garantir a sanitização dos produtos, consiste na adição de químicos como ácidos, nitratos, nitritos, sulfitos, entre outros (FREITAS;

FIGUEIREDO, 2000, MELO; BOAS; JUSTO, 2009). Estudos revelam que a ingestão em concentrações elevadas podem gerar prejuízos à saúde, a manifestação dessas doenças podem ser agudas ou crônicas e os efeitos estão ligados aos níveis ingeridos e a frequência de ingestão. A curto prazo são observadas alergia e alterações no comportamento, no entanto, a longo prazo, são evidenciados casos de carcinogênese (POLONIO; PERES, 2009).

Atualmente ocorre a crescente procura por métodos alternativos aos produtos sintéticos, essa prática deve-se, sobretudo, à responsabilização dos prejuízos ambientais e à saúde humana e animal, ao uso de produtos sintéticos (SILVEIRA et al., 2012, BANDONI; CZEPAK, 2008). Como alternativa ao uso de antimicrobianos sintéticos, teve início a incessante busca por produtos químicos naturais capazes de inibir ou eliminar o crescimento de microrganismos.

Registros históricos revelaram o uso de plantas e aplicações de seus subprodutos na agricultura, contudo, na medicina, essas práticas firmaram-se como os alicerces de importantes sistemas médicos tradicionais (VEIGA; BOLZANI; BARREIRO, 2006). As terapias e eventuais curas relacionadas a enfermidades em seres humanos estavam ligadas às práticas de ingestão ou aplicação de ervas e extratos vegetais que duraram até o século XIX (PAN et al., 2014).

As plantas superiores são consideradas fontes de substâncias químicas naturais biologicamente ativas que estão sendo estudadas para a produção de novos compostos que apresentam aplicações biológicas, principalmente no tratamento de doenças. Estas moléculas são compostos derivados do metabolismo secundário, que em suas reações químicas geram moléculas intermediárias diversas com particulares graus de complexidade. Dentre essas moléculas encontram-se aquelas que fazem parte da constituição dos óleos essenciais (FIGUEIREDO et al., 2008; SOARES, 2010).

Os óleos essenciais são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais, principalmente, nas partes aéreas, contudo, sua distribuição depende das características de cada espécie, atuam no metabolismo secundário em atividades relacionadas com a sobrevivência do vegetal (LIMA et al., 2006; GURIB-FAKIM, 2006). Os óleos essenciais encontrados nas plantas apresentam características importantes, alguns compostos são capazes de apresentar respostas anti-inflamatória, antioxidante e microbicide (GURIB-FAKIM, 2006).

Santurio et al. (2007), em seu estudo avaliaram a atividade inibitória e bactericida de óleos essenciais de tomilho, orégano e canela sobre sorovares de *Salmonella enterica*.

Diante da preocupação pelo aumento nos números de casos de infecções fúngicas e bacterianas, neste estudo propõe-se estudar através de ensaios *in vitro* o efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento bacteriano, identificar os principais componentes de cada óleo

essencial e testar a atividade antioxidante, a fim, de avaliar o uso destes compostos naturais como alternativas ao controle de microrganismos patogênicos, bem como, o potencial uso em produtos cosméticos ou alternativas aos conservantes sintéticos.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Metabolismo secundário de plantas

Os vegetais são indispensáveis à vida do homem, como importantes fontes de alimento e matéria-prima para construção de residências, meios de transporte, vestuário, bem como, são empregados em tratamentos para curar doenças e manifestações artísticas, culturais e religiosas. Atualmente, representam uma das alternativas aos diversos insumos utilizados pelas indústrias, por serem parcialmente controlados pelo homem, encontrados na natureza e representarem fontes renováveis (SIMÕES et al., 2004).

Algumas plantas podem apresentar simultaneamente características aromáticas, condimentares e medicinais e sua utilização é valorizada desde as primeiras civilizações (FREITAS et al., 2012).

Plantas ou ervas aromáticas são aquelas que possuem substâncias capazes de sensibilizar o olfato de seres humanos de maneira agradável. Plantas ou ervas condimentares são usadas na gastronomia, para realçar o sabor e o aspecto dos alimentos, algumas apresentam propriedade de conservação. Plantas ou ervas medicinais possuem substâncias bioativas, que em função da concentração, podem possuir propriedades tóxicas ou curativas (UPNMOOR, 2003).

No Brasil, o uso de plantas aromáticas, condimentares e medicinais remete ao período pré-colonial, quando os povos indígenas já aplicavam ervas para curar doenças, esses costumes foram mantidos pelos colonizadores e tornaram-se amplamente utilizados na atualidade, nas formas de chás e xaropes (MENDONÇA, 2004).

Atualmente, para atender as exigências dos consumidores, as propriedades antimicrobianas dos Óleos Essenciais (OEs) têm despertado interesse por, constituírem uma alternativa quanto ao uso de aditivos naturais em alimentos (TASSOU; KOUTSOUMANIS; NYCHAS, 2000; MENDONÇA, 2004). Quando a finalidade desses óleos é inibir o crescimento microbiano, as concentrações devem ser maiores daquelas utilizadas para realçar o sabor e o aroma dos alimentos. Para Shelef (1983), a concentração necessária para ocorrer inibição varia de 1 a 5%, a medida que, o uso culinário não ultrapassa 1%, o que não é suficiente para inibir a atividade microbiana. Portanto, a determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano realçador de sabor e aroma dos alimentos é primordial para a utilização dos óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos.

O metabolismo das plantas é estritamente ligado a fisiologia da mesma, quando estudado é classificado em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é

indispensável à manutenção da vida em todas as espécies vegetais, é conservativo e controla o desenvolvimento celular. Atuam nesses processos substâncias comuns, tais como ácidos nucleicos, carboidratos, clorofila, lipídeos e proteínas (TAIZ; ZIGER, 2006).

Até pouco tempo não haviam informações para afirmar assertivamente qual a função do metabolismo secundário das plantas, acreditava-se que poderiam ser erros do metabolismo, desintoxicação e excreta (PROBOST, 2012). Com o estudo de diversas áreas, o metabolismo em seres vivos passou a ser melhor compreendido a partir da década de 1950, os compostos resultantes do metabolismo secundário entre grupos taxonômicos irmãos, ou exclusivos para determinada espécie, oferecem vantagens adaptativas ao desenvolvimento das espécies que os sintetizam, sendo as principais vantagens em processos de adaptação a variação de temperatura, estresse hídrico e defesa contra microrganismos patogênicos e herbívora (SALES, 2015; STEFENS, 2010).

Diversos herbívoros utilizam os compostos derivados do metabolismo secundário que apresentam características farmacológicas, ao praticar farmacofagia esses animais buscam compostos não nutritivos, mas importantes para a defesa ou reprodução (BOPPRÉ, 1984).

O uso de plantas e derivados pelo homem, para os mais diversos fins é tão antigo quanto a história da civilização (FIRMO et al., 2011; HALBERTEIN, 2005). Essa prática é importante para as gerações atuais, o conhecimento aprendido, acumulado e transposto é estudado pela etnofarmacologia, ramo da ciência que reconhece pistas de substâncias com potencial de aplicação principalmente medicina contemporânea, através de estudos antropológicos, botânicos, bioquímicos, farmacológicos e químicos. (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

Segundo a OMS, 25% dos medicamentos comercializados no mundo derivam direta ou indiretamente do uso de plantas medicinais, quando considerados medicamentos para tratamento de doença específica os dados podem ser ainda maiores, em países desenvolvidos o uso de antimicrobianos e antitumorais pode representar 50%. Se considerado o uso de práticas complementares ao tratamento tradicional, de 70 a 90% da população em países como Alemanha e França que fazem uso do conhecimento popular, enquanto em países pouco desenvolvidos ou em desenvolvimento as taxas são similares no tratamento orientado pelo conhecimento popular, contudo, o tratamento com medicamentos padronizados e regulamentados é caro e de difícil acesso (WHO, 2011).

Os processos de industrialização de novos medicamentos têm como grande desafio a identificação e o isolamento de novos compostos bioativos, o que gera alto custo (PINTO et al., 2002; LI; VEDERAS, 2009; ATANASOV et al., 2015). Muitas substâncias biologicamente ativas identificadas apresentam alto grau de complexidade química, de difícil reprodução

laboratorial diante das tecnologias disponíveis, o que muitas vezes inviabiliza a continuidade do processo (WALSH; FISCHBACH, 2010). Probost (2012), enfatiza que mesmo apresentando as características necessárias, como alto potencial, não significa que um composto resultará em um medicamento.

2.2 Óleos Essenciais (OEs)

Os OEs, ou óleos voláteis, foram definidos no século XVI por Paracelso, como sendo a “quinta essencia”, constituínte do princípio ativo de uma droga (PROBOST, 2012). A resolução nº 2 de 2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define óleo essencial como o produto volátil de origem vegetal obtido por processos físicos. Os OEs são misturas complexas de diferentes moléculas químicas, geralmente apresentam odor e coloração característica, que detêm a maior parte dos créditos das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais (STEFENS, 2010). O processo de hidrodestilação é o mais utilizado para a obtenção de OEs para fins comercializáveis (PEREIRA, 2010).

A composição de um OE é determinada pelo genótipo, contudo, a ação de fatores abióticos, como temperatura, luminosidade, estresse hídrico que uma planta é submetida, pode interferir significativamente na atividade de um óleo essencial produzido (MORAIS, 2009; SILVA et al., 2010). Com composição diversa, o principal grupo que aparece são os terpenos e derivados aromáticos (SIMÕES et al., 2004; PEREIRA, 2010).

Quimicamente são divididos em três grande grupos: alcalóides, compostos fenólicos e terpenóides (TAIZ; ZIGER, 2006; VIZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). Embora apresentam grande diversidade, um óleo essencial, geralmente apresenta um composto em maior concentração, geralmente denominados de compostos majoritários, outros poucos compostos em concentração média e muitos em pouca concentração chamados de elementos traços (SIMÕES et al., 2004).

Os alcalóides são compostos cíclicos que possuem ao menos um átomo de hidrogênio e, seu anel, geralmente com caráter alcalino, de baixo peso molecular, são famosos por constituírem substâncias com efeito no sistema nervoso, tais como morfina e cafeína (VIZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os flavonóides formam um grupo de compostos fenólicos, os quais, quimicamente possuem ao menos um anel aromático no qual ao menos um átomo de hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (VIZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). Muito diversos, mais de 5.000 compostos foram caracterizados, sendo assim, considerada a classe fenólica mais

importante (BRAVO, 1998). Os compostos fenólicos também atuam sobre os radicais livres, a capacidade antioxidante é extremamente importante em sistemas biológicos e em alimentos (FERRARI, 2013).

Os terpenóides, formam a classe de produtos naturais obtida de plantas com maior variedade de compostos e aplicações para os seres humanos, a maioria dos compostos apresentam baixo peso molecular e são de natureza lipofílica (BAKKALI et al., 2008). Os monoterpenos são conhecidos por serem voláteis, estão presentes no odor das flores, amplamente extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas para a fabricação cosméticos e aromatizantes (TAIZ; ZIGER, 2006; VIZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). Os sesquiterpenos e alguns monoterpenos, podem agir como compostos antimicrobianos e anti-herbivoria. As resinas ácidas, apresentam compostos como paclitaxel®, um importante quimioterápico e a forskolina, principal medicamento utilizado no tratamento de glaucoma, são diterpenos (VIZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

O tratamento alternativo ao uso de medicamentos vem crescendo significativamente, muitas pessoas utilizam-se das partes aéreas das plantas para o preparo de infusões ou o uso do óleo extraído da planta para uso como medicamento fitoterápico devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais (RAMALINGUM; MAHOMOODALLY, 2014; PRAKASH et al. 2013).

A ocorrência de estresse oxidativo, é resultante do desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes. Estudos sobre os radicais livres se intensificaram nas últimas décadas, sendo que, as evidências conduzem para estreita relação entre esses radicais e diversas doenças, como arteroesclerose, artrite, doenças degenerativas e cardiovasculares, além de mutagênese e carcinogênese., (SILVA; FERRARI, 2011; FLORENCE, 1995; PHAM-HUY; HE; PHAM-HUY, 2008; LOBO et al., 2010). Contudo, a presença de álcoois e fenóis pode gerar efeito citotóxico se utilizado em concentrações desconhecidas (SACCHETTI et al., 2005).

A indústria alimentícia realiza esforços contínuos para substituir os aditivos sintéticos por substâncias naturais que desempenhem função similar, evitando o ataque por microrganismos, conseqüente deterioração e ingestão de toxinas, além disso, os óleos essenciais podem desempenhar funções antioxidantes (SACCHETTI et al., 2005; FLOROS; NEWSOME; FISHER, 2010).

No setor agrícola o uso de bioinseticidas apresenta uma crescente área de estudo e desenvolvimento, principalmente na produção de frutas e hortaliças com certificado de produto orgânico (JACOB et al., 2016).

2.2.1 Ação antimicrobiana de OEs

Devido à grande diversidade química presente nos OEs, estes conseguem apresentar atividade antimicrobiana em diversos grupos de microrganismos, tais como bactérias, fungos e protozoários (LOBO et al., 2010; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

De acordo com Gonzáles-Lamothe et al. (2009), os OEs podem atuar de duas maneiras sobre os microrganismos: como atenuantes, quando o óleo essencial age como mediador na resposta emitida pelo sistema imunológico do hospedeiro frente à uma infecção; ou potencializadores, quando o uso do OEs favorece a atividade do antibiótico, que geralmente, por multirresistência do microrganismo impõe ação limitada do medicamento.

O estudo da atividade antimicrobiana exercida pelos OEs tem sido descrita por diversas pesquisas, elas envolvem o uso de OEs provenientes de diversas espécies de vegetais e microrganismos. Em revisão, Swamy; Akhtar; Sinniah (2016), concluem que a ação de um óleo essencial pode ser observado pelas diferenças estruturais entre bactérias de espécies gram-positivas e espécies gram-negativas.

Os monoterpenos atuam sobre a membrana celular, com caráter lipofílico, esses alteram o funcionamento, resultando em aumento da fluidez, alteração no potencial de membrana, e alteração na respiração celular, para melhor compreensão da ação, Trombetta et al. (2005), desenvolveram ensaio *in vitro* para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, frente a ação de três monoterpenos: acetato de linalino, mentol e timol, ambas espécies apresentaram sensibilidade. A espécie *S. aureus*, bactéria gram-positiva foi mais sensível a ação dos compostos sobre a porção lipídica da membrana plasmática.

Zengin e Baysal (2014), determinaram a atividade antibacteriana de quatro compostos terpenóides: α -terpineol, linalol, eucaliptol e α -pineno, com diferentes concentrações e combinações, em ensaios *in vitro* de espécies bacterianas que geram infecções e deterioração de alimentos, a *E. coli* O157: H7 foi a espécie que apresentou melhores resultados, com valores de concentração inibitória mínima menor 0,7% v/v.

Ghabraie et al. (2016), demonstraram a atividade antibacteriana de 32 OEs para quatro espécies de bactérias patogênicas: *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, e *Salmonella Thyptomurium*, e uma espécie de deterioração de alimento *Pseudomonas aeruginosa*, através dos métodos de difusão em ágar, micro-atmosfera e diluição em caldo, aonde verificaram a ação dos compostos dos OEs na fase sólida quando adicionado a casca diretamente sobre o meio de cultivo, no método de difusão em ágar, gasosa aquecendo o óleo até entrar em ebulição e adicionando o vapor à microatmosfera da placa de petri e líquida diluindo o óleo essencial em

meio líquido. Dentre os OEs testados, na fase gasosa, adicionando 30 µL do extrato vegetal, apenas dois OEs inibiram todas espécies bacterianas testadas com halo de 20-60 mm. Na fase líquida, um óleo essencial apresentou Concentração Inibitória Mínima de 470 ppm, na fase sólida, cinco OEs apresentaram halo de inibição entre 20-40 mm.

Maharaj, Devi, Prasad (2016), testaram o efeito antibacteriano de nove OEs frente as espécies *S. thypomurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, através do método de difusão em ágar onde foram usados 200 µL de óleo, todos os óleos testados apresentaram efeitos sobre uma ou mais espécies, destacando-se a *Cinnamomum zeylancium* (canela), que apresentou atividade antimicrobiana sobre as cinco espécies bacterianas.

2.2.2 Atividade antioxidante de OEs

Diversos estudos apontam para os radicais livres como coadjuvantes no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurológicas, motoras e imunológicas, devido aos danos causados quando gerada uma situação de estresse oxidativo. Os radicais livres ocorrem de maneira natural no metabolismo, contudo, quando exposto a fatores exógenos pode gerar o desequilíbrio e desencadear a produção exagerada de radicais livres.

O estudo de OEs como substâncias naturais antioxidantes pode ser observado em diversas pesquisas.

Kulisic et al. (2004) ao estudar as propriedades do óleo essencial de orégano, constataram que o timol e o carvacrol eram os compostos majoritários desse, apresentava efeito similar que o antioxidante sintético BHT (Hidroxitolueno Butilado), através do método de eliminação de radicais DHPP, em processos de oxidação de produtos cárneos.

Ao mesmo tempo, Sahin et al. (2004), analisaram os efeitos antimicrobianos e antioxidantes do extrato de *Origanum vulgare* (Orégano), os resultados revelaram que 10 entre as 24 espécies de bactérias testadas no experimento são sensíveis ao extrato e a capacidade de inibição à 50% (IC₅₀) para o radical DHPP foi de 8900 µg mL frente ao antioxidante sintético BHT que apresentou IC₅₀ de 19,8 µg mL⁻¹.

Wei e Shibamoto (2007), examinaram treze OEs quanto a atividade antimicrobiana e compostos com alta atividade oxidante, o composto mais abundante no óleo de Patchouli foi o patchoulol (28,8%), com atividade antioxidante variando entre 30 e 90% a uma concentração de 200 µg mL⁻¹.

Andrade et al. (2012), demonstraram a capacidade antioxidante de óleos de canela, citronela e gengibre, para a o método de DHPP, apenas o óleo de citronela apresentou atividade, registrando IC₅₀ igual a 517,40 µg mL⁻¹.

Andrade et al. (2013), ao estudar a composição e a atividade antioxidante de óleo de pimenta e negramina, verificaram que os compostos presentes em maior concentração são monoterpenos e sesquiterpenos, quando avaliado a capacidade antioxidante pelo método de DHPP nenhum dos óleos apresentou atividade de captura.

Souza (2013), avaliou a atividade antioxidante dos óleos de araçá, goiaba, guabiroba, jabuticaba, pitanga e acerola, a maior atividade antioxidante total foi obtida pelo extrato de guabiroba 13439,45 uM trolox/ g de folha, goiaba e jabuticaba apresentaram valores similares 7039,23 e 6451,28 uM trolox/ g de folha respectivamente, assim como, araçá 5018 uM trolox/ g de folha e pitanga 5897,76 uM trolox/ g de folha, sendo que os quatro últimos são estatisticamente iguais.

Miranda et al. (2015), estudaram as propriedades atioxidantes dos óleos essenciais de *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Tithonia diversifolia*, *Ambrosia polystachya*, *Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia*, em sequestrar o radical DHPP, nenhuma das espécies apresentou valor de IC₅₀ mensurável, enquanto o padrão BHT resultou em IC₅₀ de 48,84 µg mL.

Siddique et al. (2016), verificaram a composição e a atividade antioxidante de três espécies de melaleuca, *Melaleuca bracteata* F. Muell, *Melaleuca fulgens* R. Br. subsp. *steadmanii* e *Melaleuca leucadendron* (L.) L, o composto mais concentrado para as três espécies foi o Eugenol éter metílico com 82, 87 e 95%, respectivamente, as três espécies apresentaram alta capacidade antioxidante DHPP entre 80 e 89% de inibição.

2.3 Bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos sintéticos

Com a descoberta do primeiro antibiótico em 1928 incentivou a produção industrial de fárcamos e estudos que permitiram a descoberta de novos medicamentos. Estima-se que anualmente são produzidos mais de 100 mil toneladas de antibióticos no mundo (NIKAIDO, 2010).

Com o aumento no uso de fárcamos sintéticos nas últimas décadas, a incidência de doenças microbianas cresceu proporcionalmente. O uso indiscriminado e contínuo de medicamentos antimicrobianos no tratamento de infecções alterou o ambiente para os microrganismos, contudo, os mesmos se adaptaram e passaram a adquirir resistência aos

fármacos (TANWAR et al., 2014; CHANG et al., 2015). Para Orsi, Falcone, Venditti (2011), o surgimento de microrganismos multiressistentes tornaram-se um problema de saúde pública.

O uso de produtos naturais frente aos sintéticos está associado à necessidade de deter o crescente aumento no número de cepas de microrganismos resistentes a antimicrobianos sintéticos (GYAWALI; HIBRAHIM, 2014). Os microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos são a principal via responsável por doenças e mortes em países em desenvolvimento (TASSEW et al., 2010).

A família Enterobacteriaceae uma das mais importantes famílias de bactérias existentes, a essa família pertence a *E. coli* o organismo mais estudado do mundo. É uma bactéria gram-negativa, anaeróbico facultativo, ocorre naturalmente no cólon, porção final do intestino grosso dos seres humanos. Geralmente esses microrganismos não oferecem riscos, pois compõem a flora natural do intestino, mas algumas cepas podem causar intoxicação alimentar severa (PAULA; CASARIN; TONDO, 2014; TRABULSI et al., 2004).

Com diversos mecanismos para desencadear infecções, a *E. coli*, apresenta classificação pelo tipo de infecção que causa, são pelo menos cinco categorias famosas, as enteropatogênicas, estão relacionadas com infecções intestinais, enterotoxigênicas, estão associadas à produção das toxinas termo lábil e termoestável que agredem as células da mucosa intestinal, enteroinvasoras, agem nas células do cólon intestinal gerando febre e diarreia que pode apresentar sangue, enterohemorágicas, esse grupo é caracterizado pela produção da toxina Shiga que provoca diarreia que pode ou não ser sanguinolenta, sendo fatal em crianças, uropatogênica, é responsável por causar a infecção no trato urinário de seres humanos e animais, em casos graves chega aos rins causando danos irreversíveis (TRABULSI et al., 2004; CORREA, 2012; GOMES et al. 2016).

Em 2012, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) estimaram em mais de 265 mil casos anuais, destes, mais de 3.500 precisam ser hospitalizados e 30 foram os óbito, somente por *E. coli* enterotoxigênica.

A espécie *Salmonella enteritidis* pertencente também a família Enterobacteriaceae, assim como a *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa, apresenta ainda grande motilidade propiciada pelo batimento flagelar (GIANELLA, 1996; ANDINO; HANNING, 2015). As bactérias do gênero *Salmonella* apresentam a capacidade de infectar os seres humanos e a maioria dos animais domésticos, como cães, gatos e pássaros (TRABULSI et al., 2004; ZHAO et al., 2017).

Krzyanowski et al. (2014), avaliaram a presença de genes, presença de plasmídeo e resistência a antibióticos, de 54 amostras de *Salmonella* obtidas de água e plantas, todas as

Salmonellas spp. apresentaram ao menos um gene conhecido para a resistência e não foram afetadas pelo antibiótico tetraciclina, a presença de plasmídeo ocorreu em 40% das amostras.

Nos EUA, a transmissão de *Salmonella* é realizada principalmente através do alimento, os custos para o tratamento de 1,4 milhões de infecções registradas em 2010 foi de 2,72 bilhões de dólares, mais de 70% dos casos foram registrados pela ingestão de alimentos contaminados (ANDINO; HANNING, 2015). Yang et al. (2016) relacionam o grande número de casos de infecções por *Salmonella* à demora no processo de detecção da mesma, os métodos de identificação atuais, embora, confiáveis demandam tempo e exigem grande esforço, afirmam que técnicas de detecção rápida e confiável auxiliariam na diminuição do número de casos graves.

A bactéria *Staphylococcus aureus* pode compor a microbiota do organismo sem causar doenças, mas é uma das espécies bacterianas patogênicas com grande importância, é pertencente ao grupo das gram-positivas e capaz de gerar diferentes infecções, que vão de localizadas e superficiais e em casos específicos geram infecções maiores de nível sistêmico. Sua importância tem aumentado nos últimos anos, devido a incidência em infecções hospitalares, pois, ao sintetizar toxinas, estas agem sobre a membrana celular ocasionando danos (TRABULSI et al., 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Os seios nasais são o principal local de colonização por *S. aureus* podendo estar presente em 40% dos adultos (EVANGELISTA; OLIVEIRA, 2015).

Köck et al. (2010), revela que para aquele ano, estimava-se a ocorrência de 150 mil episódios infecciosos em ambientes hospitalares na União Europeia (EU), onde 280 milhões de euros seriam gastos para o tratamento desses pacientes. Embora a ocorrência de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) é distribuída de maneira endêmica, o estudo revelou a tendência a o contínuo aumento no número de cepas MRSA.

Em 2011, o CDC publicou informativo para a população norte americana, mostrando uma diminuição no número de mortes causados por infecções estafilocócicas, reduzindo em 9.000 o número de óbitos anuais. SIT et al. (2017), demonstraram que a taxa de prevalência de infecções associadas a *S. aureus* MRSA é maior no continente asiático, atingindo principalmente pessoas do sexo masculino com idade superior a 50 anos.

As infecções bacterianas causam centenas de milhares de mortes todos os anos e geram prejuízos financeiros na casa de bilhões de reais. O aumento do número de espécies patogênicas que apresentam adaptações que permitem resistir aos tratamentos existentes é preocupante. Nesse sentido buscar recursos que permitam complementar o tratamento existente e

alternativas, aliadas a higiene pessoal e de alimentos, devendo ser prioridade para a redução desse problema de saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a bioatividade antibacteriana e antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Pogostemon cablin* (patchouli), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Casearia sylvestris* Swartz (Guaçatonga), *Lavandula angustifolia* Miller (Lavanda) e *Melaleuca anternifolia* Cheel (Melaleuca). Testar a atividade antibacteriana será realizada sobre as espécies *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. enterica* (ATCC13076).

3.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais das espécies supracitadas.
- b. Verificar a ação antimicrobiana dos óleos através da técnica de microdiluição em placa para determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.
- c. *In vitro* analisar o comportamento da curva de crescimento bacteriano para cada espécie e quando adicionado o óleo essencial.
- d. Determinar a composição química de cada óleo essencial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos óleos essenciais

O processo de Hidrodestilação foi realizado por colaboradores e consistiu no preparo de uma mistura de água com biomassa proveniente das folhas colocados em balão volumétrico, em seguida o balão volumétrico foi acoplado ao extrator e teve início o processo de aquecimento da mistura, quando essas atingem seu ponto de ebulição, os vapores de água e demais compostos voláteis são direcionados ao condensador, onde ocorreu a troca de calor, resultando na condensação dos vapores e dos compostos voláteis, a separação dos mesmos ocorre por diferença de densidade, possibilitando que a água retorne ao sistema em seu estado líquido e o óleo seja separado e removido do sistema no tubo separador.

Os óleos essenciais de Lavanda, Citronela, Melaleuca, Guaçatonga, Patchloui e Pitanga, obtidos a partir do método de Hidrodestilação, foram coletados e armazenados em frascos âmbar envoltos em papel alumínio, sendo levados ao refrigerador à 4°C.

4.2 Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) *S. enterica* (ATCC13076) cedidas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRV da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro e armazenadas no banco de microrganismos do laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos.

4.3 Preparo do Meio de Cultivo

O meio de cultivo utilizado foi o Caldo Mueller Hinton como sugerido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e está de acordo com o Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*). O meio foi pesado em balança semi-analítica e dissolvido em um béquer por água destilada conforme recomendação do fabricante, posteriormente o meio foi transferido para erlenmeyer e esterilizado por calor úmido em autoclave a 121°C por 15 minutos. O meio líquido (caldo) foi armazenado em erlenmeyers. O meio sólido (ágar) foi resfriado a 40°C em seguida foi

transferido em placas de Petri estéreis e incubados a 37°C para prova de esterilidade antes de seu uso.

4.4 Preparo do Pré inóculo

Quarenta e oito horas antes da realização do experimento foram reativadas as espécies bacterianas utilizadas no experimento, para tal, foi preparado para cada cepa bacteriana, um frasco com 50 mL de meio de cultivo como descrito no item (4.3), e adicionado uma alçada de bactérias da placa estoque, após foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C ± 1°C, por vinte e quatro horas.

Na cabine de biossegurança foi aberto o erlenmeyer do pré inóculo, retirando e transferindo com a alçada à alíquota de 10 µL, de cada pré inóculo para o inóculo. O inóculo de cada bactéria foi então incubado a 35°C por oito horas em estufa com agitação orbital a 100 rpm.

4.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, para tal, foram utilizadas placas de microdiluição com 96 poços de acordo com o determinado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a norma M7 -A6 do CLSI, com alterações.

A disposição dos óleos essenciais foi conduzida de acordo com a Figura 1. Nas linhas que correspondem de A até G, foram utilizadas as diluições dos seguintes óleos essenciais: A - Pitanga, B- Citronela, C - Patchouli, D - Guaçatonga, E - Chia, F- Melaleuca e em G - Lavanda.

Todos os orifícios das microplacas (exceto os da coluna 1) foram preenchidos com 25µL de caldo Mueller Hinton, sendo que no poço da coluna 1 foi preparado uma solução com a adição de 40µL de caldo Mueller Hinton + 10µL da solução de óleo + 1µL do agente surfactante tween 80 obtendo-se assim, as seguintes concentrações iniciais de acordo com a densidade de cada óleo previamente pesados em balança analítica: Pitanga (191,44mg mL); Citronela (168,66mg mL); Patchouli (187,70mg mL); Guaçatonga (180,24mg mL); Chia (184,82mg mL); Melaleuca (181,46mg mL) e Lavanda (196,21mg mL). Posteriormente, foram realizadas as diluições sucessivas transferindo 25µL da concentração inicial contida no poço 1, para o poço seguinte, reduzindo a concentração em 50% a cada transferência, até o poço de número 12. Para os poços da coluna 12, foram retirados os 25µL excedentes, para manter o

volume igual. A linha H representou os controles positivos, também foram realizados controles de meio de cultivo, do agente surfactante, do crescimento do inóculo, dos óleos vegetais e do Cloreto de trifeniltetrazólio TTC, como mostra a (Figura 1).

Figura 1 - Organização dos tratamentos para teste de CIM.

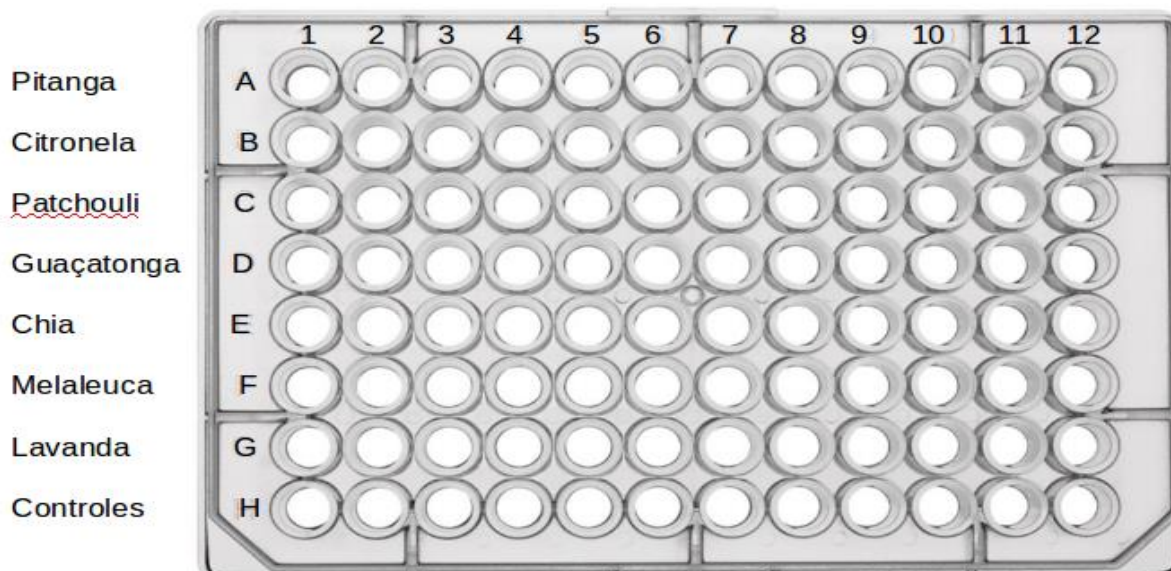


Figura 1- esquematiza a disposição dos tratamentos em função dos óleos utilizados, em A - Pitanga, B- Citronela, C - Patchouli, D - Guaçatonga, E - Chia, F- Melaleuca e em G - Lavanda. H, correspondeu aos controles dos tratamentos em H.1 – controle positivo para ampicilina: 1µL de Ampicilina, 10µL de Inóculo e 40µL de caldo; H.2 – Caldo Muller Hinton: 40µL de caldo; H.3 – Surfactante Tween 80, H.4 – Inóculo; H.5 – H.11 óleos essenciais na ordem pitanga, citronela, patchouli, guaçatonga, chia, melaleuca e lavanda: cada poço recebeu 10µL do óleo e 40µL do caldo; e H.12 – Cloreto de Trifeniltetrazólio: 5µL de cloreto de trifeniltetrazólio e 45µL de caldo.

Fonte: autoria própria.

As replicatas foram incubadas em estufa a 35°C por vinte horas, em seguida foram adicionados em cada poço da microplaca 5µL de Solução de Cloreto de Trifeniltetrazólio 1%, as microplacas foram incubadas por mais duas horas antes da realização da leitura da CIM.

O TTC, apresenta comportamento de indicador, devido a atividade óxido reductiva, em que algumas enzimas desidrogenases do metabolismo celular realizam a conversão do 2,3,5 trifeniltetrazólio em 1,3,5 trifenilformazan, conferindo a coloração avermelhada, revelando a existência de células vivas (GABRIELSON et al., 2002).

4.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a incubação das microplacas foram realizadas as determinações da CBM. Com o auxílio de micropipetador foi retirado uma alíquota de 10µL de cada poço e replicadas em placas de meio Ágar Mueller Hinton com o auxílio de alça de Drigalski então, as placas foram

incubadas a 35° C por vinte e quatro horas. Após este período, as colônias foram contadas e considerada a concentração bactericida aquela em que houve inibição maior ou igual a 90% do crescimento bacteriano.

4.7 Determinação dos compostos dos óleos essenciais

Os compostos de cada óleo essencial foram determinados através de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, essa etapa foi realizada por colaboradores e as análises gentilmente cedidas pelo professor Dr. Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando injeção automática (TripPlus As, Thermo) em um cromatógrafo gasoso (Focus GC, Thermo) acoplado a um espectrômetro de massas de íon trap (Polaris Q, Thermo). As amostras foram injetadas com divisão de fluxo (Split) 1:50 (1µL), e separadas através de coluna cromatográfica modelo DB-5 (30 m x 0,025mm, Agilent). A separação dos compostos foi feita com temperatura do injetor a 230°C, linha de transferência 250°C, com fluxo constante e compensação a vácuo. Programação de temperatura do forno; 40°C, isoterma de 6 min, aquecimento até 300°C na taxa de 3°C.min⁻¹, com isoterma final de 5 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo de ionização por impacto de elétrons á 70 eV, com temperatura da fonte de íons em 200°C.

4.8 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade de o óleo sequestrar o radical 2,2-difenilp-1-pricil-hidrazil (DHPP), para tal seguiu-se a metodologia descrita por Brand-Williams et.al, (1995), adaptada. Foram adicionados em cubetas 25 µL de óleo essencial a 2 mL de uma solução metanólica e DHPP a $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1}$. Seguindo a curva de calibração foi construída sobre soluções metanólicas de concentrações conhecidas para comparação com a curva de calibração de TROLOX, nas seguintes concentrações, de 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 umol L⁻¹, os resultados foram lidos em espectrofotômetro UV-vis com comprimento de onda em 517 nm, após homogeneizar suavemente e permanecer em temperatura ambiente por 30 min, ao abrigo de luz. Os resultados foram expressos em umol Trolox Equivalentes (TE) mL, do óleo utilizado na curva de calibração ($y=737 - 2,70 \times 10^{-4} X$, $r^2= 0,998$).

4.9 Curva de Crescimento Bacteriano

Após a determinação da CIM, foi realizado um novo ensaio, para verificar a ação dos óleos essenciais sobre a curva de crescimento dos microrganismos.

4.9.1 Pré-inóculo

Foi preparado para cada cepa bacteriana, um frasco erlenmeyer com 50mL de meio de cultivo como descrito no item (4.3), e adicionado uma alçada de bactérias da placa estoque, após foram incubadas em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por vinte e quatro horas.

Na cabine de biossegurança foi aberto o erlenmeyer do pré-inóculo, retirando e transferindo com a alçada à alíquota de $10\mu\text{L}$, de cada pré-inóculo para um erlenmeyer com 50 mL de caldo Muller Hinton obtendo-se o inóculo. O inóculo de cada bactéria foi então incubado a 35°C por dez horas em shaker com agitação orbital a 100 rpm.

4.9.2 Padronização das concentrações do inóculo

Na cabine de biossegurança foi aberto cada erlenmeyer do inóculo e transferiu-se 1mL para cubeta estéril. Com o espectrofotômetro zerado com o meio de cultivo, realizou-se a leitura da absorvância (ABS) das respectivas alíquotas a um comprimento de onda de 625 nm.

Então, calculou-se e adicionou-se a quantidade necessária do volume do inóculo necessário para obter uma concentração de 0,08 absorvância, considerando densidade ótica em comprimento de onda de 625nm equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL, em cada um dos frascos. Posteriormente foram adicionados o volume de CIM de cada um dos óleos essenciais para cada cepa bacteriana. Obtendo-se os frascos para o ensaio bacteriano. Como controle foram utilizadas as cepas bacterianas e o meio de cultivo.

4.9.3 Ensaio Bacteriano

Os erlenmeyers contendo 50 mL de meio com inóculos bacterianos e os óleos essenciais foram incubados em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com agitação a 100 rpm.

Para os tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 12 horas foram retiradas, em ambiente estéril, alíquotas de 1 mL em eppendorf, em triplicata, logo após foram centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm, descartou-se o sobrenadante, a biomassa foi ressuspensa em 1mL de solução salina estéril, em

seguida lidas a absorbância em comprimento de onda de 625nm, no espectrofotômetro zerado com solução salina estéril.

4.10 Análise Estatística

4.10.1 Atividade Atimicrobiana

Para os dados de CIM e CBM, foi realizado estatística descritiva, observado como melhor resultado para os óleos essenciais, o valor mais próximo do controle positivo.

4.10.2 Curva de Crescimento Bacteriano

Para determinar se havia diferença estatística entre os óleos essenciais de pitanga, citronela, melaleuca, guaçatonga, patchouli e lavanda e o controle utilizou-se o modelo estatístico fatorial 7 x 6, cujos fatores foram 7 tratamentos (controle e 6 óleos essenciais) em triplicatas e os tempos amostrais (0, 2, 4, 6, 8 e 12 horas) para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. enterica*.

Primeiramente realizou-se a análise das pressuposições do modelo matemático de normalidade e homogenidade através do teste de Lilliefors e Cochran, respectivamente, ambos a 5 % de significância. Quando as pressuposições não eram atendidas realizou-se transformações ($1/\sqrt{x+c}$, $1/\sqrt{x}$ e $\text{Arcsen}(x)$). Em seguida aplicou-se a análise de regressão através do software Assistat 7.7.

Os gráficos foram construídos com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2010.

4.10.3 Atividade Antioxidante

Para os dados da atividade antioxidante DHPP dos óleos essenciais de pitanga, citronela, melaleuca, guaçatonga, patchouli e lavanda foi realizado análise estatística descritiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Atividade Antimicrobiana dos óleos essenciais

Os resultados obtidos para Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg mL⁻¹ dos óleos essenciais. Como controle foi utilizado o antibiótico Amoxicilina.

Espécie bacteriana		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. enterica</i>	
Óleos essenciais		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Controle	(Amoxicilina)	0,146	0,29	0,146	1,17	0,29	0,58
<i>Eugenia uniflora</i>	(Pitanga)	1,49	5,98	2,98	11,96	2,98	5,98
<i>Cymbopogon winterianus</i>	(Citronela)	2,63	10,54	2,63	5,27	5,27	5,27
<i>Melaleuca anternifolia</i> Cheel	(Melaleuca)	2,83	5,67	2,83	11,34	2,83	22,68
<i>Casearia sylvestris</i> Swartz	(Guaçatonga)	45,06	90,12	45,06	90,12	45,06	90,12
<i>Pogostemon cablin</i>	(Patchouli)	2,93	23,46	2,93	11,73	93,85	93,85
<i>Lavandula angustifolia</i> Miller	(Lavanda)	3,06	24,52	3,06	6,13	6,13	6,13

Fonte: Autoria própria.

Todos os óleos essenciais testados apresentaram valores de atividade inibitória e bactericida superiores ao do controle padrão amoxicilina para as bactérias testadas. Verificase que o óleo de pitanga foi o mais eficiente para o teste de CIM frente a cepa de *E. coli* com valor de 1,49 mg mL⁻¹ e quanto à atividade bactericida, o óleo de melaleuca mostrou-se o mais eficiente com CBM de 5,67 mg mL⁻¹. Para a bactéria *S. aureus*, o óleo de citronela foi o mais efetivo com a CIM de 2,63 mg mL⁻¹ e 5,27 mg mL⁻¹ de CBM. O óleo de Melaleuca mostrou-se o mais eficaz na inibição do crescimento da bactéria *S. enterica*, com valor de 2,83 mg mL⁻¹ para a CIM. No entanto, foi o óleo essencial de Citronela que teve a melhor CBM (5,27 mg mL⁻¹).

O óleo de guaçatonga registrou o mesmo valor de CIM e CBM para as três bactérias, 45,06 mg mL⁻¹ e 90,12 mg mL⁻¹ respectivamente, mostrando-se os menos eficientes sobre as cepas de *E. coli* e *S. aureus*, não apresentando efeito antimicrobino importante. Valores

semelhantes foram registados com o óleo de Patchouli com CIM e CBM de 93,85 mg mL⁻¹ frente a bactéria *S. enterica*.

Belusso (2014), registrou valores semelhantes, de CIM e CBM, respectivamente, para o óleo essencial de melaleuca, a maior diferença observada foi a ausência de atividade bactericida do óleo sobre a capa de *S. aureus* 2,50 mg mL⁻¹ e 0,0 mg mL⁻¹, 1,04 mg mL⁻¹ e 5,00 mg mL⁻¹ para *E. coli*. No estudo utilizou uma bactéria do gênero *Salmonella*, o autor encontrou 1,32 mg mL⁻¹ e 4,37 mg mL⁻¹.

Simic et al. (2008), avaliaram a composição e a atividade antimicrobiana da citronela sobre diversas espécies de bacterianas e fúngicas, no teste o óleo essencial apresentou boa atividade sobre as espécies bacterianas gram-positivas e pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana sobre espécies gram-negativas.

Victoria et al. (2012), testaram pelo método de difusão em disco a atividade antimicrobiana do óleo essencial de pitanga para diferentes espécies bacterianas, dentre elas *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteritidis*, obteve resultados significativamente diferentes do presente trabalho, obtendo 0,8 mg mL⁻¹ de CIM para *S. aureus*, para as bactérias *E. coli* e *S. enteritidis* não foram registrados valores de inibição.

A diferença estrutural entre bactérias, tais como a pequena camada de peptídeoglicana e a membrana externa das bactérias gram-negativas que é constituída principalmente de lipopolissacarídeos, não estão presentes em bactérias gram-positivas. Estas diferenças são possíveis explicações para os valores de atividades dos óleos sobre as bactérias testadas. Além disso, alguns compostos podem apresentar lipofilia, conferindo maior capacidade de penetrar a membrana das células.

Quando observados os valores da CIM com os respectivos gráficos obtidos das curvas de crescimento bacteriano, de maneira geral, visualiza-se que todos os óleos essenciais apresentaram alguma atividade sobre o crescimento das três espécies de bactérias. O grupo controle, corresponde a bactéria e meio de cultivo, sem a adição de óleos, apresentou crescimento visível para todas as espécies de bactérias.

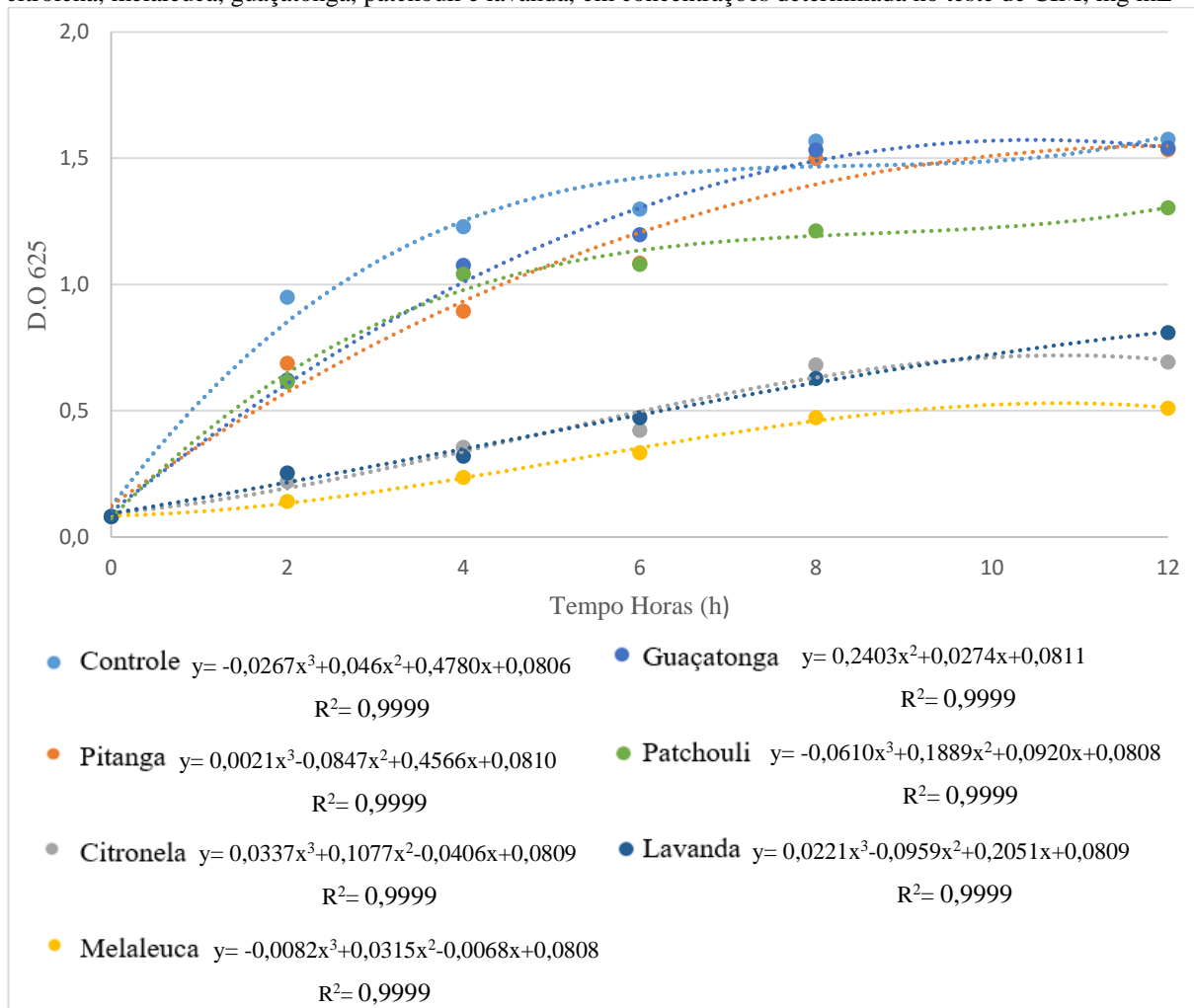
Conforme observado em todos os gráficos, todas as curvas de crescimento apresentam um comportamento crescente, significando que os óleos essenciais apresentaram apenas efeito inibitório e não apresentaram efeito bactericida sobre as espécies testadas.

Vizualizou-se pouca eficiência do óleo de pitanga na curva de crescimento, diferindo dos resultados obtidos nos testes de CIM. Admitindo que todos os passos descritos na metodologia foram realizados de maneira correta, atribuiu-se a característica do óleo de pitanga em apresentar cor ligeiramente alaranjada, influenciando na leitura de absorbância, por isso,

pressupõe-se que o tempo em que as amostras foram submetidas a centrifugação não foram suficientes para o óleo em particular separar-se das células bacterianas.

Ao observar as curvas de crescimento das bactérias *E. coli* e *S. enterica* (Gráficos 1 e 3), verificou-se que os óleos essenciais de melaleuca, citronela e lavanda apresentaram os menores valores de D.O₆₂₅ sendo indicativo de maior atividade inibitória.

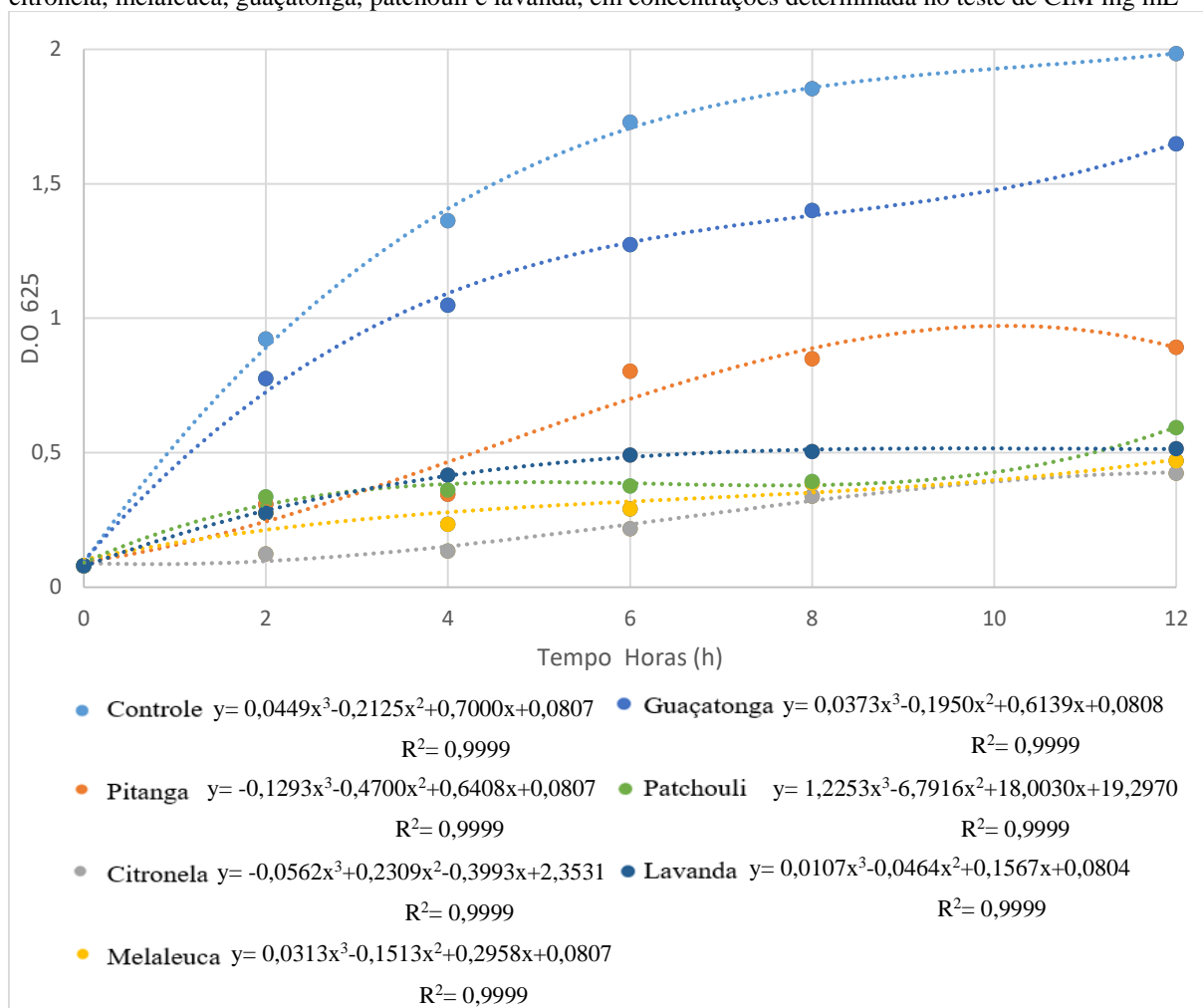
Gráfico 1 – Curva de crescimento da bactéria *Escherichia coli*, com os tratamentos dos óleos em de pitanga, citronela, melaleuca, guaçatonga, patchouli e lavanda, em concentrações determinada no teste de CIM, mg mL⁻¹



Fonte: autoria própria.

As curvas de crescimento dos óleos essenciais de pitanga, citronela, melaleuca, guaçatonga, patchouli e lavanda para a bactéria *S. aureus*, contidas no Gráfico 2, mostraram que o óleo essencial de citronela registrou valores semelhantes aos óleos de melaleuca, patchouli e lavanda, indicando a ocorrência de atividade inibitória.

Gráfico 2 - Curva de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, com os tratamentos dos óleos em de pitanga, citronela, melaleuca, guaçatonga, patchouli e lavanda, em concentrações determinada no teste de CIM mg mL⁻¹



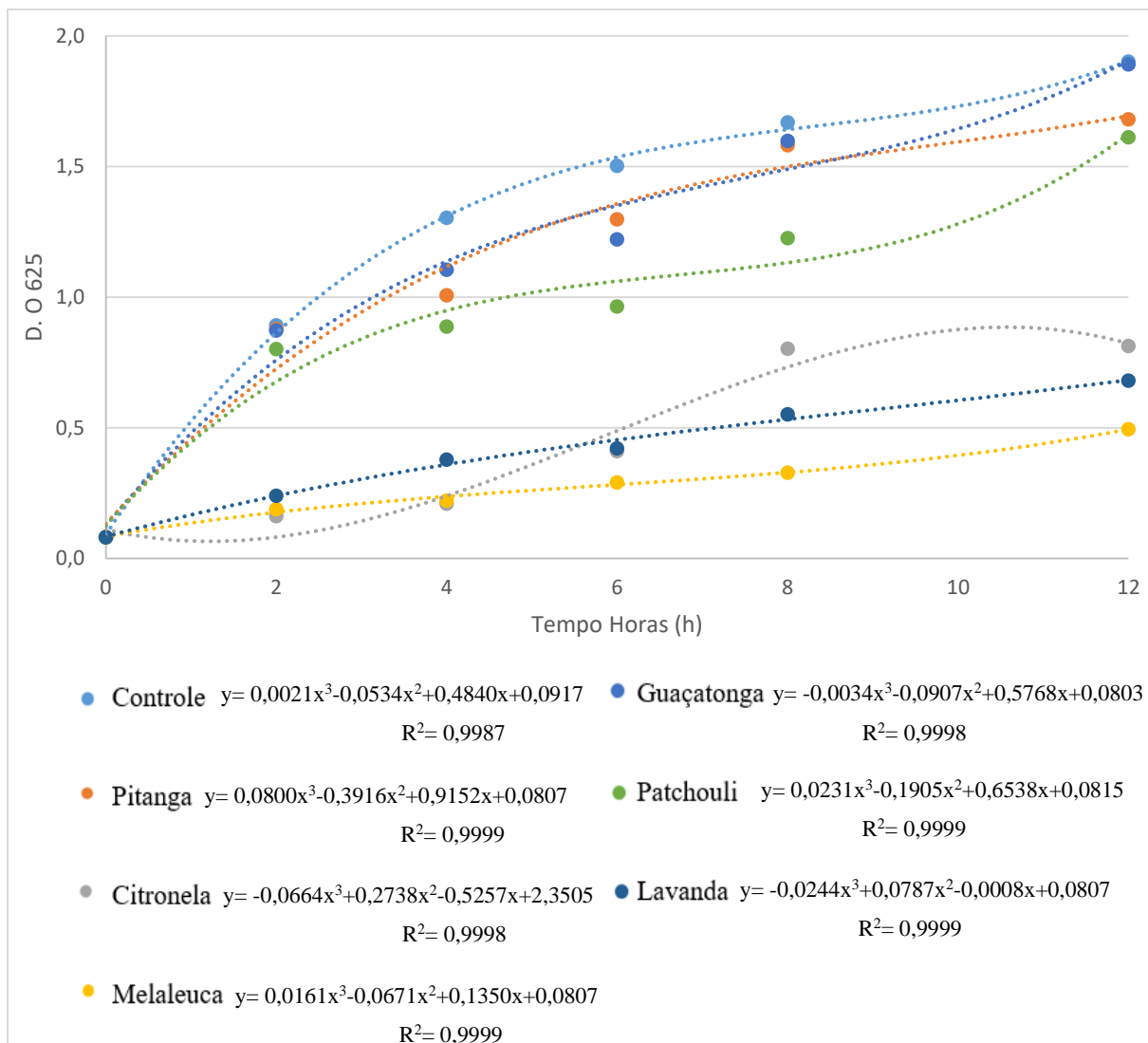
Fonte: autoria própria.

Percebe-se ainda no Gráfico 1, que as curvas de crescimento dos óleos de pitanga, guaçatonga e patchouli até o ponto amostral 6 horas, registraram comportamento semelhantes ao controle, nos tempos amostrais que seguiram, a curva de crescimento para a bactéria *E. coli* apresentou menor taxa de crescimento bacteriano.

Enquanto no Gráfico 2, apenas a curva de crescimento do óleo essencial de guaçatonga apresentou comportamento semelhante ao controle, indicando pouca atividade inibitória.

Para a bactéria *S. enterica*, verifica-se que as curvas de crescimento dos óleos de guaçatonga, pitanga e patchouli apresentaram comportamento semelhante ao controle, indicando pouca atividade inibitória (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Curva de crescimento da bactéria *Salmonella enterica*, com os tratamentos dos óleos em de pitanga, citronela, melaleuca, guaçatonga, patchouli e lavanda, em concentrações determinada no teste de CIM, mg mL⁻¹



Fonte: autoria própria.

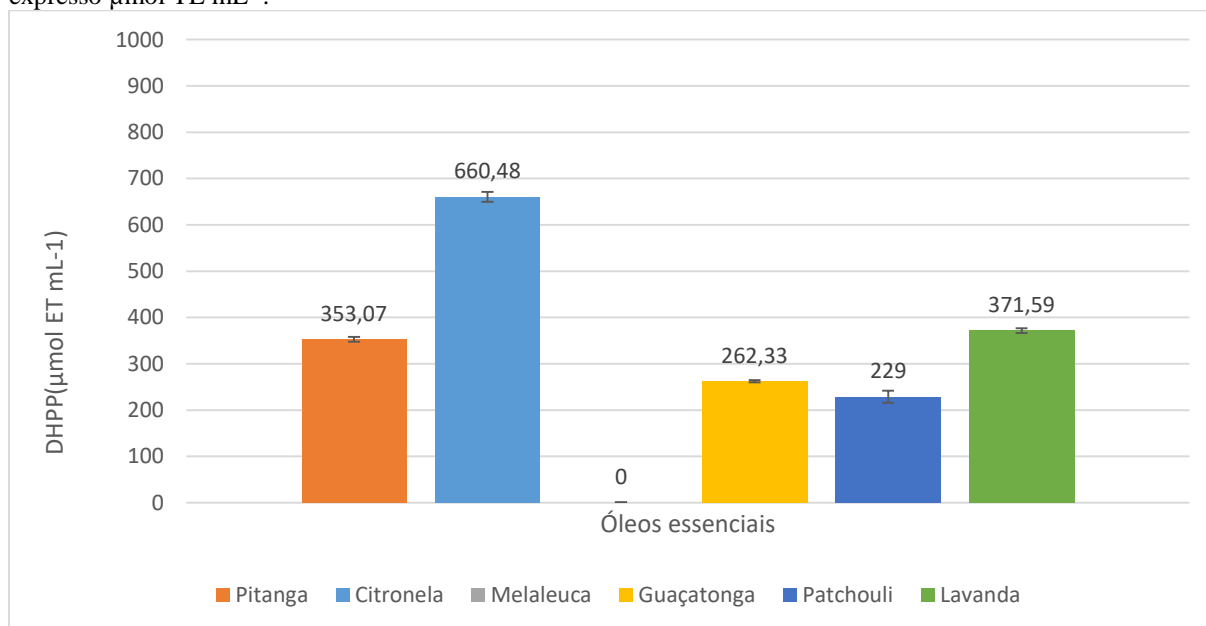
Desta forma, como não há garantia deste pressuposto e o teste F da análise de variância é muito sensível à normalidade e a homogeneidade, não pode-se seguir com os testes estatísticos considerando a abordagem pautada no delinemaneto experimental proposto. Outras modelagens alternativas poderiam contornar esse problema como, a abordagem bayesiana, a partir de reamostragem via o Método de Monte Carlo em Cadeias de Markov. Mas como esta seria uma programação de dados trabalhosa, para um trabalho de conclusão de curso não foi implementada no presente trabalho.

5.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

O gráfico 4, apresenta os valores obtidos para atividade de captura de DHPP, dos óleos essenciais testados. O óleo essencial de citronela apresentou o valor de 660,48 DHPP $\mu\text{mol TE}$

mL^{-1} , Lavanda e Pitanga apresentaram valores de $371,59 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ e $353,07 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$ respectivamente. Seguidos de guaçatonga $262,33 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$, patchouli $229,00 \mu\text{mol TE mL}^{-1}$. O óleo de melaleuca, por apresentar valores de absorvância menores que a curva de calibração do teste, não apresentou atividade antioxidante DHPP.

Gráfico 4 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais testados através do método de sequestro de radicais DPPH expresso $\mu\text{mol TE mL}^{-1}$.



Fonte: Profa. Dra. Paula Fernandes Montanher – UTFPR, campus Dois Vizinhos.

Scherer et al. (2009), determinaram a atividade antioxidante do óleo essencial de citronela em $743 \mu\text{g mL}^{-1}$. Luzia, Bertanha, Jorge (2010), determinaram que o óleo essencial de pitanga apresentou grande capacidade de captura do radical DHPP com IC_{50} igual a $30,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. No presente trabalho o óleo essencial de citronela e pitanga, apresentaram grande capacidade de captura do radical DHPP.

5.3 Composição dos Óleos Essenciais

Os óleos de pitanga (Tabela 2), citronela (Tabela 3), melaleuca (Tabela 4), guaçatonga (Tabela 5), patchouli (Tabela 6), foram ordenados em tabelas de acordo com a concentração dos compostos identificados seguindo o índice de Kovats calculado (I_{kcal}).

No total 53 compostos, dentre o total apenas 3 compostos estiveram presentes em mais que um óleo essencial, foram o 1,8-cineol, σ -amorfeno e γ -muroleno. Individualmente cada óleo essencial apresentou de 3 até 12 componentes identificados, com concentrações variáveis.

No óleo essencial de pitanga foram identificados 12 compostos, o calamen-10-ona foi o mais abundante 20,21%, seguido do Silfiperferol-6-em-5-ona 10,06%. Gallucci et al. (2014), identificaram a composição do óleo essencial de pitanga, selina-1,3,7 (11)-trien-8-ona corresponde a 34% do óleo, os compostos sesquiterpenos oxigenados correspondem a 64,6% do óleo.

Tabela 2 – Composição química do óleo essencial de *Eugenia uniflora* (Pitanga), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS.

Composto	IKcal.	% Relativa
Calamen-10-ona	1716,12	20,21
Silfiperferol-6-em-5-ona	1625,83	10,06
Germacrona	1688,93	6,61
Gemacreno B	1555,44	6,24
Curzereno	1490,88	5,79
σ -amorfenol	1514,98	5,46
E- cariofileno	1415,78	5,18
α -cubeno	1345,38	3,05
α -gurjuneno	1402,02	2,43
β -elemeno	1386,75	2,16

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelo professor Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos.

Na composição química da citronela foi possível observar como elemento majoritário o β -citronelal que sozinho corresponde a 34,15 %, seguido pelo o Geraniol 10,45% e limoleno 7,98%, assim como na pitanga, foram identificados doze compostos. Simic et al. (2014), encontraram como principais componentes da citronela trans-geraniol, citronelal e citronelol. Lorenzo et al. (1999), caracterizou a composição química do óleo essencial de citronela, identificando 31 substâncias diferentes, as mais presentes foram citronelal, geraniol e β -citronelol, afirma ainda, que a presença de acetatos de citronelil e acetato de citronelil e geranila são características de plantas brasileiras.

Tabela 3 – Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS.

Composto	IKcal.	% Relativa
β -citronelal	1157,35	34,15
Geraniol	1253,66	10,45
Limoneno	1030,13	7,98
β -citronelol	1229,49	6,48
γ -muroleno	1477,27	5,8
Acetato de citronelil	1351,27	5,57

Composto	IKcal.	% Relativa
γ -candineno	1514,71	5,36
Acetato de geranila	1378,96	5,31
Gemacreno-D-4-ol	1572,89	2,26
B-elemeno	1386,54	1,58
α -muroloeno	1502,38	1,45
γ -armofeno	1493,9	1,27

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelo professor Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos.

A Tabela 4. mostra a composição química da melaleuca, dentre todos os óleos essenciais, foi a menos diversa, dela foram identificados três compostos o α -thujineno, 1,8-cineol, α -terpineol, que somados correspondem a 86,96%.

Lemos (2008), determinou a composição do óleo essencial de melaleuca, identificou 32 compostos, a grande maioria elementos traços, que aparecem em pequenas quantidades, os compostos α -thujineno, 1,8-cineol e α -terpineol apresentaram concentrações baixas.

Tabela 4 – Composição química do óleo essencial de *Melaleuca anternifolia* Cheel (Melaleuca), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS.

Composto	IKcal.	% Relativa
1,8-cineol	1035,43	72,31
α -terpineol	1194,72	8,55
α -thujineno	934,65	6,1

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelo professor Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos.

Os resultados da análise cromatográfica do óleo de guaçatonga (Tabela 5) mostrou que possui diversos componentes com valores com percentual próximos a 20%, os três componentes mais abundantes são γ -muroloeno 19,55%, α -zingibereno 15,24% e o σ -amorfoeno 13,17%, juntos representam 47,96 % do óleo. TININIS et al. (2006), estudaram a variabilidade química do óleo essencial de guaçatonga, os obtendo como componentes principais sesquiterpenos monocíclicos, germacremo-B e germacremo-D.

Tabela 5 – Composição química do óleo essencial de *Casearia sylvestris* Swartz (Guaçatonga), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS.

Composto	IKcal.	% Relativa
γ -muroloeno	1478,66	19,55
α -zingibereno	1492,02	15,24
σ -amorfoeno	1515,49	13,17
β -elemeno	1387,18	6,43
E-cariofileno	1415,77	5,65

Composto	IKcal.	% Relativa
Germacreno B	1555,18	4,25
α -copeno	1373,06	3,63
σ -elemeno	1333,7	3,57
β -gurjuneno	1434,46	2,51
α -humureno	1452,3	1,83
α -caninol	1652,46	1,67
Cubeno	1345,38	0,88

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelo professor Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos.

O componente mais abundante no óleo de patchouli foi Patchoulol 21,99%, seguido do α -guaieino 18,32% e do γ -patchouleno 16,44%, representam 56,75% do óleo, além desses outros sete componentes foram identificados. Costa, Carvalho e Deschamps, 2012, estudaram a composição química do óleo essencial de patchouli. Assim como o óleo testado no presente trabalho, o patchoulol foi o composto mais abundante e maior concentração 55%. Wei e Shibamoto (2007), relataram o patchoulol como componente majoritário.

Tabela 6 – Composição química do óleo essencial de *Pogostemon cablin* (Patchouli), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS.

Composto	IKcal.	% Relativa
Patchoulol	1668,86	21,99
α -guaieino	1435,19	18,32
γ -patchouleno	1499,74	16,44
Seicheleno	1446,55	10,6
α -patchouleno	1458,49	6,58
β -patchouleno	1380,92	4,8
β -carofileno	1416,03	3,61
cis- β -guaieino	1492,71	3,61
allo aromadreno	1461,09	3,18
Pogostol	1655,66	1,18

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelo professor Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos.

O 1,8-cineol representa 43,73% da composição química do óleo de lavanda, além deste, os trans-verbenaol e fenchona com 12,77% e 11,71%, respectivamente, aparecem em maiores concentrações. Outros cinco compostos aparecem em concentrações menores. Verma et al. (2010), determinaram que o composto majoritário do óleo essencial de lavanda é o acetato de linalil. TOMESCU et al. (2015), obtiveram como composto em maior concentração o linalol.

Tabela 7 – Composição química do óleo essencial de *Lavandula angustifolia* Miller (Lavanda), obtidos pela análise cromatográfica em GC/MS.

Composto	IKcal.	% Relativa
1,8-cineol	1034,26	43,73
trans-verbenol	1148	12,77
Fenchona	1088,5	11,71
exo-fenchol	1119,5	5,26
α -pineno	977,65	4,53
α -thujineno	934,46	3,84
β -selineno	1484,91	1,88
Camfeno	951	1,49

Fonte: Dados gentilmente fornecidos pelo professor Sérgio Miguel Mazaro da UTFPR campus Dois Vizinhos.

A variabilidade encontrada nos componentes de óleos essenciais é imensa, o óleo essencial de lavanda geralmente apresenta como compostos principais linalol, acetato de linalilo, terpinen-4-ol, acetato de lavandulol (PRUSINOWSKA; KRZYSZTOF, 2014). Contudo, o óleo essencial de lavanda testado no presente trabalho não apresentou em sua composição ao menos uma dessas substâncias. Esse comportamento é verificado devido a influências dos fatores abióticos, como temperatura, umidade, sazonalidade, dentre outros, não apenas para o óleo essencial de lavanda.

6 CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho permite concluir que:

Os compostos encontrados nos óleos essenciais das espécies testadas apresentam efeito antibacteriano sobre as espécies de *E. coli*, *S. aureus* e *S. enterica* em função da concentração adicionada dos compostos.

A curva de crescimento bacteriano pode ser utilizada para verificar o comportamento das bactérias frente a adição dos OEs obtidos no teste de CIM.

Quanto à capacidade de capturar o radical de DHPP, o óleo essencial de citronela apresentou maior valor e o óleo essencial de melaleuca não apresentou atividade antioxidante DHPP.

As composições dos óleos essenciais são diversas, embora pré-determinadas no material genético, a influência do meio foi evidenciada. Alguns óleos não apresentaram composto majoritário como o óleo de guaçatonga, enquanto outros a existência deste ficou evidente, no caso da melaleuca.

Os óleos essenciais apresentam potencial uso para aplicação na indústria farmacêutica, agroquímica e alimentícia. Os resultados mostraram-se promissores, o que possibilita incentivar trabalhos futuros, na ordem de verificar a ação sinérgica de um ou mais óleos essenciais sobre espécies bacterianas. Também podem ser avaliadas a ação antifúngica desses compostos para espécies deteriorantes de alimentos e micotoxigênicas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. V. 23, n. 2, 2005.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 2 de 15 de Janeiro de 2007**. Ministério da Saúde, Jan. 2007.
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. **Scientific World Journal**, v. 2015, n. ID 520179, p. 1-16, Jan. 2015.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n.2, p. 399-408, Abr/Jun. 2012.
- ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**. v. 2, n. 1, p. 384-397, Nov. 2013.
- ARABESTANI, M. R.; KARAMI, M.; ALIKHANI, M. Y. Antimicrobial Resistance in Microorganisms. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**. v.1, n.1, p. 12-21. Abr. 2014.
- ARAUJO, J. C. L. V et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, Jan-Jun. 2004.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**. v. 33, n. 8, p. 1582-1614, Ago. 2015.
- BANDONI, A. L; CZEPAK, M. P. (Orgs.) **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. 1ª ed. Vitória: Eduffes, 2008.
- BELUSSO, L. C. S **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e associações com conservantes de alimentos**. 2014. 47 f. (Trabalho de Conclusão De Curso) – Tecnologia de processos químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2014.
- BOPPRÉ, M. Redefining “pharmacophagy”. **Journal of Chemical Ecology**. v. 10, n. 7, p. 1151-1154, Fev. 1984.
- BRAVO, L. P. Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p. 317-338, 1998.
- BRAND-WILLIAMS, et al. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, Jan. 1995.
- CARSON, R. **Silent Spring**. Boston: Houghton Mifflin, 1962.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Bloodstream Infections in Patients with Central Lines: A preventable and costly threat to patient safety. **CDC VitalSings**, Atlanta, v.1, n.1, Jan. 2011.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) In **Annual Report**, 2012.

CHANG, H. et al. Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 1, p.101-116, Mar. 2015.

CONTE, F. A. Efeitos do consumo de aditivos químicos alimentares na saúde humana. **Revista Espaço Acadêmico**. v. 1, n.181, p. 69-81 Jun.2016.

CORREA, F. A. F. Características dos patótipos de *E.coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos. In. **Seminários Aplicados**. Goiânia: UFG, 2012.

COSTA, G. A.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; DESCHAMPS, C. Rendimento e composição do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) conforme o tempo de extração. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. V. 15, n. 3, p. 319-324, Out. 2012.

EVANGELISTA, S. de S.; OLIVEIRA, A. C. *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente adquirido na comunidade:um problema mundial. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 68, n. 1, p. 136-143, Jan/Fev. 2015.

FABRICANTE, D. S.; FRANSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspective**. v. 109, n. 1, p. 69-75, Mar. 2001.

FERRARI, A. P. **Atividade alelopática, antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico**. 2013. 115 f. (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, Mai. 2008.

FIRMO, W. C. A. et al. Historical context, popular use and scientific conception on medicinal plants. **Caderno de Pesquisas**. v. 18, n. 5, p. 90-95, Dez. 2011.

FLORENCE, T. M. The role of free radicals in disease. **Clinical & experimental Ophthalmology**, v.23, n. 1, p. 3-7, Fev. 1995.

FLOROS. J. D.; NEWSOME, R.; FISHER, W. Feeding the world today and tomorrow: The importance of food science and technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 2010, n. 1, p. 1-28, 2010.

FREITAS, A. C.; FIGUEIREDO, P. Conservação de alimentos. 1ª ed. Lisboa: Apoio, 2000.
FREITAS, A. V. L. et al. Os raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 10, n. 2, p. 147-156, Abr/Jun 2012.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, Jun. 2002.

GALLUCCI, S. et al. Essential oil of *Eugenia uniflora* L.: an industrial perfumery approach. **Journal of Essential Oil Research**, v.22, n. 2, p. 176-179, Out. 2014.

GHABRAIE, M. et al. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. **Food Science and Technology**, v66, n. 1, p. 332-339, Mac. 2016.

GIANELLA, R. A. Salmonella, *In*. BARON, S. (Org). **Medical Microbiology**, 4 ed. Glaveston: Medical Branch, 1996, cap. 21.

GYAWALI, R.; IBRAIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, n. 1, p. 412-429, Dec. 2014.

GOMES, T. A. T. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n.1, p. 3-30, Dez. 2016.

GONZÁLEZ-LANOTHE, R. et al. Plant antimicrobial agents and their effects on Plant and Human pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 10, n. 1, p. 3400-3419, Jul. 2009.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 27, n.1, p. 1-93. Ago. 2006.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**. v. 15, n. 9, p. 686-699, Out. 2005.

JACOB, R. G. et al. Óleos essenciais como Matéria-prima sustentável para o preparo de produtos com maior valor agregado. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n.1, p. 18-40, Dez. 2016.

KÖLK, R. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. **Euro Surveillance**, v. 15, n. 41, p. 1-9, Out. 2010.

KRZYŻANOWSKI, F. et al. Quantification and characterization of Salmonella spp. isolates in sewage sludge with potential usage in agriculture. **BioMed Central Microbiology**, v. 14, n. 263, p. 107-117, Out. 2014.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v.85, n. 1, p. 633-640, Jul. 2004.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**. v. 325, n. 5937, p. 161-165, Jul. 2009.

LIMA, I. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201. Abr/Jun. 2006.

LEMOS, D. R. H. **Influência da temperatura do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel**. 2008. 53 f. (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Review**, v. 4, n. 8, p. 118-126, Jul/Dez. 2010.

LORENZO, D. et al. Composition and Stereoanalysis of *Cymbopogon winterianus* Jowitt oil from Southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 1, p. 177-181, Dez. 1999.

LUZIA, D.; BERTANHA, B. J; JORGE, N. Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 175-180, Mar. 2010.

MAHARAJ, P. P. P.; DEVI, R.; PRASAD, S. Antimicrobial effect of essential oils of some Fijian medicinal plant leaves on pathogenic bacteria. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, v. 34 n. 2, p. 35-39, 2016.

MELO, A. A. M.; BOAS, E. V. B. V.; JUSTO, C. F. Uso de aditivos químicos para a conservação pós-colheita de banana “maça” minimamente processada. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 33, n. 1, p. 228-236, Jan/Fev. 2009.

MENDONÇA, A. T. **Efeitos dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 f. (Tese) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, Jan/Mar. 2016.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, p. 450-463, Ago. 2009.

NIKADO, H. Multidrug resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n.1, p. 119-146, Mar. 2010.

ORSI, G.; FALCONE, M.; VENDITTI, M. Surveillance and management of multidrug-resistant microorganisms. **Expert Reviews Anti-infective Therapy**, v. 9, n. 8, p. 653-679, Mar. 2011.

PAN, S. et al. Historical perspective of traditional indigenous medical practices: The current renaissance and conservation of herbal resources. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2014, n. 1, p. 1-20, Abr. 2014.

PAULA, C. M. D.; CASARIN, L. S.; TONDO, E. C. *Escherichia coli* O157:H7- patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária Debate**, v. 2, n. 4, p. 23-33, Out. 2014.

PAUW, B. E. What Are Fungal Infections? **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.3, n.1, Jan. 2011.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus L'herit*** (Myrtaceae). 2010. 69 f. (Dissertação) - Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2010.

PERSIDIS, A. Antibacterial and Antifungal drug discovery. **Nature Biotechnology**. v. 17, n. 11, p. 1141-1142, Nov. 1999.

PHAM-HUY, L.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, Jun. 2008.

PIMENTEL, V. P. et al. O desafio de adensar a cadeia de P&D de medicamentos biotecnológicos no Brasil. **BNDS Setorial**. v. 1, n. 38, p. 171-211, Dez. 2013.

PINTO, A. C et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **QUÍMICA NOVA**. v. 55, n. 1, p. 45-61, Mai. 2002.

POLONIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, Ago. 2009.

PRAKASH, O. et al. Anticancer potential of Plants and Natural Products: A review. **American Journal of Pharmacological Sciences**. v. 1, n. 6, p. 104-115, Dez. 2013.

PROBOST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012. 112 f. (Dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2012.

PRUSINOWSKA, R.; KRZYSZTOF, B. S. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. **Kerva Polonica**, v.60, n. 2, p. 56-66, 2014.

RAMALINGUM, N. R.; MAHOMOODALLY, M. F. The therapeutic potential of medicinal foods: A review. **Advances in Pharmacological Sciences**. v. 2014, n. ID 354264, p. 1-18, Abr. 2014.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n.1, p. 621-632, Ago. 2005.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-india, citronella e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, Abr. 2009.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 1, p. 549-557, 2004.

SALES, H. J. S. P. *Lavandula* L. - aplicação da cultura in vitro à produção de óleos essenciais e seu potencial económico em Portugal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 17, n. 4, p. 992-999, Fev. 2015

SALOMON, J.; SAGASTI, F.; SACHS-JEANET, C. Da tradição a modernidade. **Estudos Avançados**, v. 7, n. 17, Jan/Abr. 1993.

SANDE-BRUISNMA, N. V. et al. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.11, p.1722-1730, Nov. 2008.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto hospitalar. **Texto e contexto enfermagem**, v.13, n.1, Fev. 2004.

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

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects on spices. **Journal of Food Safety**, Westport, n. 6, p. 29-44, Mar. 1983.

SIDDIQUE, S. et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oils from leaves of Three *Melaleuca* species of Pakistani flora. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 1, n. 18, p. 18-29, Jan. 2016.

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, Mar. 2011.

SILVEIRA, R. M. C. F.; BAZZO, C. Ciência, tecnologia e suas relações sociais: a percepção de geradores de tecnologia e suas implicações na educação tecnológica. **Ciência e Educação**, v. 15, n. 3, p. 681-694, 2009.

SILVEIRA, S. M. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p. 471-880, Jun. 2012.

SIMIC, A. et al. Essential oil composition of *Cymbopogon winterianus*. And *Carum carvi*. And their antimicrobial activities. **Pharmaceutical biology**. 46, n. 6, p. 437-441, out. 2008.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SIT, P. D. et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. **BioMed Infectious diseases**. v.17, n.1, p. 14, Abr. 2017.

SOARES, C.M.L. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e antitumoral de extratos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá do Cerrado)**. 2010. (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

SOARES, W. L. **Uso de agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 2010. 150 f. (Tese)

– Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Pública e Meio Ambiente. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2010.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 23, n. 2, p. 136-141, Abr. 2012.

SOUZA, W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. 37 f. (Trabalho de Conclusão de Curso) – Curso Superior de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2013.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68 f. Dissertação. (Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. M. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. 2016, p. 1-21, (ID 3012462), Out, 2016.

TANWAR, J. et al. Multidrug resistance: an emerging crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, n. 2014, ID 541340, p. 1-10, Jul. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TASSOU, C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, v.33, n. 1, p. 273-280, 2000.

TASSEW, H. et al. Microbial flora and food borne pathogens on minced meat and their susceptibility to antimicrobial agents. *Ethiopian Journal of Health Science*, v. 20, n. 3, p. 137-143, Nov. 2010.

TININIS, A. G. et al. Composição e variabilidade química de óleos essenciais de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.8, n. 4, p. 132-136, Nov. 2006.

TOMESCU, A. et al. Chemical composition of *lavandula angustifolia* L. and *rosmarinus officinalis* L. Essential oils cultivated in west Romania. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 47, n. 3, p. 246-256, 2015.

TORTORA, G. L.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, Jun. 2005.

UPNMOOR, I. (Org.) **Cultivo de Plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. 4 ed. Guaíba: Agropecuária, 2003.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology**, v.2012, n.1, p.1-26, Dez. 2012.

VEIGAS, C. J.; BOLZANI, V. da S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 326-337, Jan. 2006.

VERMA, R. S. Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. **Journal of Serbian Chemical Society**, v. 75, n. 3, p. 343-348, Ago. 2010.

VICTORIA, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n. 8, p. 2668-2674, Ago. 2012.

VIZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. In. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Documento 316: Embrapa Clima temperado. Pelotas, 2010.

WALSH, C. T.; FISHBACH, M. A. Natural Products Version 2.0: Connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**. v. 132, n. 8, p. 2469-2493, Mar. 2010.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities and volatile constituents of carious essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.5. p. 1737-1742, Feb. 2007.

WEDIG, J. C. Reflexões socioculturais acerca do mundo rural. In. SOGLIO, F. D.; KUBO, R. R. (Orgs.) **Agricultura e Sustentabilidade**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. p. 47-62.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Medicines Situation 2011-Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges, Genebra: **WHO Press**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Genebra: **WHO Press**, 2014.

YANG, Q. et al. Rapid detection of *Salmonella* in food and feed by coupling loop-mediated isothermal amplification with bioluminescent assay in real-time. **BioMed Central Microbiology**, v.16, n.1, p. 112-122, Jun. 2016.

ZHAO, X. et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v. 8, n. 1. p. 1-16, Abr. 2017.

ZENGIN, H.; BAYSAL, A. H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17773-17798, Nov. 2014.a