

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

CARINA APARECIDA NATAL

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

TOLEDO  
2016

CARINA APARECIDA NATAL

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Shioji Tiuman  
Co-orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Cristine Novak Sydney

TOLEDO  
2016

**TERMO DE APROVAÇÃO <sup>1</sup>  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II**

*Carina Aparecida Natal*

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Shioji Tiunan  
ORIENTADORA/ UTFPR câmpus Toledo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janesca Alban Roman  
AVALIADORA/ UTFPR câmpus Toledo

---

Dr<sup>a</sup>. Caroline Mariana de Aguiar  
AVALIADORA/ UTFPR câmpus Toledo

Toledo, Maio de 2016

---

<sup>1</sup> A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta. E também por ter me dado força interior para superar as dificuldades e saúde para a realização desse trabalho.

Aos meus pais Maria Aparecida Natal e José Carlos Natal que tanto amo, por sempre acreditarem no meu potencial, pelo incentivo de crescimento, pelo apoio e compreensão da minha ausência, pelos ensinamentos da vida, sendo a peça fundamental para a concretização do meu trabalho. Obrigada pelo amor incondicional!

Ao meu querido esposo Guilherme Blein, por estar o tempo todo ao meu lado, por toda paciência, compreensão, carinho e amor, e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam impossíveis. Obrigada, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao fim dessa difícil, porém gratificante jornada.

À minha orientadora Tatiana Shioji Tiuman pelas orientações, paciência, dedicação e disponibilidade de atendimentos para o desenvolvimento deste trabalho, e também pelos conhecimentos adquiridos no decorrer do curso.

À minha co-orientadora Alessandra Cristine Novak Sydney pelo apoio, sugestões e dedicação destinados a essa pesquisa.

Aos técnicos do laboratório Caroline, Danielle e Rafael pelo apoio durante a realização dos experimentos. Em especial, a Danielle Camargo pela dedicação, força, apoio e informações repassadas para elaboração dessa pesquisa.

Aos meus amigos pela compreensão, apoio, motivação e por estarem ao meu lado nas horas difíceis que precisei.

Obrigada, a todos colegas de trabalho por sempre entenderem os meus dias difíceis e pela colaboração para que eu finalizasse essa pesquisa.

E a todos que de forma direta ou indireta fizeram parte e contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado.

## RESUMO

NATAL, Carina Aparecida. **Potencial antioxidante e antifúngico de óleos essenciais de condimentos**. 2016. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2016.

A procura por produtos naturais tem aumentado nas últimas décadas, isso devido à substituição de aditivos sintéticos por naturais, tornando a alimentação mais saudável. As plantas condimentares realçam o sabor dos alimentos, e dessas são extraídos os óleos essenciais, que possuem em sua composição diferentes substâncias que atuam como agentes de prevenção na inibição de microrganismos, oxidação, estabilização de radicais livres, potencializando seu uso em indústrias alimentícias como conservadores naturais. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e antifúngico dos óleos essenciais extraídos de condimentos. Os óleos avaliados foram obtidos a partir da canela da china (*Cinnamomum cassia*), do cravo (*Syzygium aromaticum*), do tomilho branco (*Thymus vulgaris*), do orégano (*Origanum vulgare*), da hortelã do campo (*Mentha arvensis*) e do alecrim (*Rosmarinus officinalis*). O microrganismo utilizado foi *Aspergillus niger*. A técnica utilizada para determinação do potencial antifúngico foi através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e posteriormente confirmada pelo método de disco-difusão. A atividade antioxidante dos óleos foi determinada através do método de DPPH. Dentre os óleos avaliados, o óleo essencial de cravo apresentou a maior atividade antioxidante (IC<sub>50</sub>: 0,0078 mg/mL) considerado um antioxidante de ação muito forte, seguido pelos óleos essenciais de orégano (IC<sub>50</sub>:0,21 mg/mL), tomilho branco (IC<sub>50</sub>: 0,31 mg/mL) e canela da china (IC<sub>50</sub>:12,47 mg/mL), com potencial antioxidante fraco. Os óleos essenciais de alecrim e hortelã do campo, não apresentaram atividade antioxidante na concentração máxima testada de 25 mg/mL. Na determinação da atividade antifúngica foi utilizada como concentração inicial para a microdiluição 8000 µg/mL. O óleo essencial de cravo apresentou a melhor ação contra o *A. niger* (CIM: 500 µg/mL e halo de inibição: 13mm) considerado assim, um agente antifúngico forte, seguido do tomilho branco e canela da china, ambos com CIM de 2000 µg/mL, e halos de 12 mm e 11 mm, respectivamente, o óleo de alecrim apresentou uma CIM de 4000 µg/mL e halo de 10 mm. O óleo essencial de hortelã não apresentou atividade antifúngica nas concentrações testadas. De acordo com os resultados conclui-se que o óleo essencial de cravo em folhas consiste em um produto natural com excelentes características, sendo uma alternativa para a preservação de alimentos.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais. Antioxidante. Conservação. Concentração Inibitória Mínima. Disco-difusão. *Aspergillus niger*.

## ABSTRACT

NATAL, Carina Aparecida. **Antioxidant and antifungal potential of essential oils of spice.** 2016. 63 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2016.

The demand for natural products has increased in recent decades, this due to the replacement of synthetic additives for natural, making healthier food. The seasoning plants act enhancing the flavor of foods, and these are extracted essential oils, which have in their composition different substances that act as such agents in preventing the inhibition of microorganisms, oxidation, stabilization of free radicals, increasing their use in food industries as natural conservative. This study aimed to evaluate the antioxidant and antifungal potential of essential oils extracted from herbs. The oils were evaluated cinnamon (*Cinnamomum cassia*), Clove (*Syzygium aromaticum*), white thyme (*Thymus vulgaris*), oregano (*Origanum vulgare*), field mint (*Mentha arvensis*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). The microorganism used was *Aspergillus niger*. The technique used for determining the antifungal potential was through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and subsequently confirmed by disk diffusion method. The antioxidant activity of the oils was determined by DPPH method. Among the analyzed oils, essential oil of cloves had the highest antioxidant activity (IC<sub>50</sub>: 0.0078 mg/mL) considered a very strong antioxidant action, followed by the essential oils of oregano (IC<sub>50</sub>: 0.21 mg/mL) thyme white (IC<sub>50</sub>: 0.31 mg/mL) and cinnamon china (IC<sub>50</sub>: 12.47 mg/mL), with weak antioxidant potential. The essential oils of peppermint and rosemary field had no antioxidant activity at the maximum concentration tested of 25 mg/mL. In determining, the antifungal activity was used as initial concentration for microdilution 8000 µg/mL. The essential clove oil showed the best action against *A. niger* (MIC: 500 µg/mL and inhibition zone: 13 mm) thus considered a strong antifungal agent, followed white thyme and cinnamon china, both with an MIC of 2000 µg/mL, and halos 12 mm and 11 mm, respectively, rosemary oil showed a MIC of 4000 µg/mL and halo 10 mm. The essential mint oil showed no antifungal activity at the concentrations tested. According to the results it is concluded that the essential oil of clove sheets consisting of a natural product with excellent characteristics as an alternative to food preservation.

**Keywords:** Essential oils. Antioxidant. Conservation. Minimum Inhibitory Concentration. Disk –diffusion. *Aspergillus niger*.

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

mL	mililitro
$\mu$ L	microlitros
$\mu$ g	microgramas
mg/mL	miligrama por mililitro
mol/L	mol por litro
$\mu$ g/mL	micrograma por mililitro
$\mu$ M	micromolar
$\mu$ mol	micromol
nm	nanômetro
AA%	Porcentagem da atividade antioxidante
AAI	Índice de atividade antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
ET	Equivante trolox
IC50	Concentração inibitória de 50 %;
IDA	Ingestão Diária Aceitável
ISSO	<i>International Standard Organization</i>
JEC	Joint Expert Committee on Food Additives
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OE	Óleo Essencial
PG	Galato de propila
SDA	Agar Sabouraud Dextrose
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalente Trolox;
TROLOX	Ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UFC	Unidade formadora de colônias
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV/VIS	Ultravioleta visível

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Curva de crescimento de microrganismos .....	21
FIGURA 2 - Aspecto do <i>Aspergillus niger</i> .....	23
FIGURA 3 - Preparo do inóculo <i>Aspergillus niger</i> .....	31
FIGURA 4 - Representação da microplaca com 96 poços.....	33
FIGURA 5 - Forma Radicalar e não radicalar do DPPH. ....	35
FIGURA 6 - Método de disco-difusão .....	38
FIGURA 7 - Método de microdiluição.....	38
FIGURA 8 - Curva Padrão de DPPH.....	40
FIGURA 9- Exemplo de curva utilizada para a determinação da equação da reta para os óleos.....	43
FIGURA 10 - Curva Padrão de Trolox .....	44



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Informações sobre os óleos essenciais utilizados e seus principais constituintes da composição química total .....	30
TABELA 2 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e halos de inibição para os óleos testados contra o fungo <i>Aspergillus niger</i> .....	37
TABELA 3 - Valores de IC <sub>50</sub> , Índice de Atividade Antioxidante (AAI) e capacidade antioxidante em equivalente Trolox (TEAC) obtidos para cada óleo na determinação do potencial antioxidante pelo método de DPPH .....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	112
1.1 OBJETIVOS .....	13
1.1.1 Objetivo geral .....	13
1.1.2 Objetivos específicos .....	14
1.2 JUSTIFICATIVA .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1 ADITIVOS ALIMENTARES .....	15
2.1.1 Conservantes .....	16
2.1.2 Antioxidantes .....	18
2.2 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS .....	19
2.2.1 Microrganismos .....	20
2.2.1.1 <i>Aspergillus niger</i> .....	22
2.3 ÓLEO ESSENCIAL .....	23
2.3.1 Alecrim .....	25
2.3.2 Canela da China em Cascas .....	25
2.3.3 Hortelã do Campo .....	26
2.3.4 Cravo em Folhas .....	26
2.3.5 Tomilho Branco .....	27
2.3.6 Orégano .....	27
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1 Reagentes e Meio de Cultura .....	29
3.2 Microrganismo .....	29
3.3 Obtenção das amostras dos óleos essenciais .....	29
3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICA .....	30
3.4.1 Preparo do Inóculo .....	30
3.4.2 Preparo dos óleos essenciais .....	31
3.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	32
3.4.4 Disco – difusão em ágar .....	33
3.5 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	34
3.5.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos pelo método de DPPH .....	34
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37

4.1 Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais .....	36
4.1.1 Hortelã do Campo.....	39
4.1.2 Cravo da China .....	39
4.1.3 Orégano .....	40
4.1.4 Tomiho Branco .....	40
4.1.5 Canela em Cascas .....	41
4.1.6 Alecrim .....	41
4.2 Determinação da atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	42
4.2.1 Alecrim .....	45
4.2.2 Hortelã do Campo.....	46
4.2.3 Cravo da China .....	46
4.2.4 Orégano .....	47
4.2.5 Tomiho Branco .....	47
4.2.6 Canela em Cascas .....	48
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
ANEXO A Cromatograma do óleo essencial de Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	61
ANEXO B Cromatograma do óleo essencial de de canela ( <i>Cinnamomum cassia</i> ) .....	61
ANEXO C Cromatograma do óleo essencial de cravo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....	62
ANEXO D Cromatograma do óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha arvensis</i> ).....	62
ANEXO E Cromatograma do óleo essencial de tomilho branco ( <i>Thymus vulgaris</i> ).....	63
ANEXO F Cromatograma do óleo essencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	63

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos alimentícios industrializados proporcionam uma série de vantagens aos consumidores, como rapidez na hora do preparo, por serem pré-cozidos, pré-preparados ou até mesmo prontos para o consumo. Por isso, são direcionados a um amplo, crescente e mais exigente público consumidor, o que leva a um considerável crescimento da sua produção e comercialização (Organização das Nações Unidas - ONU, 2013).

A qualidade de um alimento está diretamente ligada com a sua composição, ou seja, está relacionada com a riqueza dos seus componentes, o que influenciará na composição química, física, microbiológica e organolépticas do produto final (TAKAGI, 2006; HENRIQUES, 2008; FREITAS et.al, 2010).

A preservação dos alimentos pode ser conseguida por meio da utilização de aditivos químicos ou por meio de processos físicos e biológicos, como refrigeração, secagem, congelamento, aquecimento e irradiação. Muitas vezes essas técnicas promovem a degradação de alguma propriedade ou nutriente do alimento, o que restringe a sua utilização. Nesses casos, utiliza-se conservantes e antioxidantes, que podem ser químicos sintéticos ou naturais (MARTIN, 2011).

Nas indústrias de alimentos são utilizados normalmente diferentes tipos de conservantes químicos, que além de aumentar a vida útil de prateleira do alimento tem por finalidade impedir ou retardar a alteração causada por microrganismos, que se não forem controlados, podem causar doenças ou afetar o aspecto do produto final (FAVERO et al., 2011).

Os antioxidantes adicionados nos produtos são necessários para retardar o efeito oxidativo dos alimentos. A deterioração oxidativa dos alimentos é responsável pela formação de compostos que alteram as suas características organolépticas, diminuindo o seu valor nutricional (REPETTO et.al, 2002).

Os antioxidantes agem de várias maneiras, incluindo complexação com íons metálicos, sequestro de radicais livres e decomposição de peróxidos. Muitas vezes, vários mecanismos sinérgicos estão envolvidos. O consumo de alimentos contendo uma significativa quantidade destes compostos pode ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos relacionados ao envelhecimento e doenças como arteriosclerose, diabetes, úlcera e câncer (SACHIDANANDAM et.al, 2005).

Há atualmente uma tendência em se produzir alimentos mais saudáveis e nutritivos, a fim de atender uma demanda crescente dos consumidores. Assim, a indústria alimentícia busca encontrar substâncias e técnicas alternativas para assegurar a qualidade e segurança de alimentos (MEDICE, 2007).

Uma alternativa para a conservação é a utilização de aditivos de origem natural. Os agentes naturais garantem uma alimentação segura, mantendo a mesma qualidade do produto, pois eles possuem capacidade de inibir o crescimento de microrganismos e prevenir a oxidação (MOTA et.al, 2005). Existem inúmeras moléculas que possuem essa propriedade; dentre elas, encontram-se os óleos essenciais, cuja utilização como aditivo alimentar pode propiciar a obtenção de alimentos saudáveis e de boa qualidade (TASSOU et al., 1995; FLORES, 2000).

Os condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Além desta utilidade possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais e existem aproximadamente 70 condimentos diferentes, cultivados e utilizados em todo mundo, dos quais podem fazer a extração de óleo essencial (SHELEF, 1983).

Constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, em que um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SIMÕES & SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais de condimentos para a indústria alimentícia além de produzirem aroma e sabor aos alimentos são fortes agentes antimicrobianos e antioxidantes, o que potencializam seu uso. Em razão da crescente importância de óleos essenciais no mercado e da diversidade das espécies de plantas existentes, são necessários mais estudos que viabilizem a sua utilização (SAFAEI et al., 2009).

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliação da atividade antioxidante e antifúngica de diferentes óleos essenciais de condimentos utilizados em alimentos.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Avaliar o potencial antifúngico de óleos essenciais de hortelã do campo, canela, tomilho, orégano, cravo em folhas e alecrim, frente ao fungo *Aspergillus niger*, pelo método de microdiluição e disco-difusão.

Verificar a capacidade antioxidante dos óleos essenciais de hortelã do campo, canela, tomilho, orégano, cravo em folhas e alecrim através com o uso do teste de DPPH.

Realizar comparação dos resultados obtidos com trabalhos semelhantes.

## 2 JUSTIFICATIVA

A vida moderna e o ritmo acelerado de atividades fazem com que a sociedade consuma cada vez mais alimentos processados. Buscando atender à demanda crescente do mercado consumidor, as empresas buscam cada vez mais alternativas na conservação de alimentos, já que a sua utilização é indispensável – é quase impossível um produto industrializado não conter nenhum conservante.

Mesmo os aditivos químicos sendo considerados seguros, a sua utilização encontra-se cada vez mais restrita, pois alguns, quando não utilizados em quantidades corretas, podem ocasionar doenças (FAVERO et al., 2011). Além disso, a segurança e toxicidade dessas substâncias, mesmo consideradas seguras, vêm sendo questionadas.

As principais doenças causadas por microrganismos patógenos são de origem biológicas ocasionadas por intoxicações e infecções de origem alimentar, sendo um dos causadores da contaminação os fungos filamentosos.

Além de acarretar deterioração de alimentos diminuindo o tempo de prateleira, o *Aspergillus niger* em estudo é um fungo patógeno que pode ser encontrado nos alimentos consumidos em nosso dia a dia, portanto, se faz necessário mais estudos que buscam analisar substâncias naturais capazes de inibir o crescimento desse microrganismo prejudicial à saúde.

Um das alternativas para a obtenção de um produto mais saudável, sem que se altere a composição química do mesmo, é a substituição dos aditivos sintéticos (conservantes e antioxidantes) por um natural, que possuirá a mesma eficiência. Outra alternativa é a diminuição da concentração desses agentes químicos e a análise da sua interação sinérgica

com substâncias naturais, como óleos essenciais, aumentando assim o efeito conservante e antioxidante no produto mesmo após diminuição da concentração de aditivos químicos.

Desta, forma o estudo da eficiência da substituição de conservantes e antioxidantes sintéticos por produtos naturais como os óleos essenciais é uma alternativa à produção de alimentos mais saudáveis, que apresentarão menor toxicidade, e, portanto, menos riscos à saúde da população.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ADITIVOS ALIMENTARES

A avaliação dos aditivos alimentares no âmbito mundial é adotada no controle da IDA (Ingestão Diária Aceitável), desenvolvida pelo *Joint* FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). No Brasil, elaborações e publicações da legislação que dispõe sobre o uso de aditivos competem a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que, por sua vez, define aditivos como qualquer substância intencionalmente adicionado aos alimentos sem o desígnio de nutrir objetivando modificar as características dos alimentos e aumentar sua vida útil (BRASIL, 1997).

É evidente a importância dos aditivos sob o ponto de vista tecnológico na produção de alimentos. Porém, é necessário estar atento aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser acarretados pela ingestão frequente dessas substâncias (POLÔNIO, 2010).

Os alimentos sofrem uma constante atividade biológica, de natureza química, física e microbiológica, e em consequência há perda na sua qualidade e redução da sua vida útil. Destas alterações, as mais importantes para a segurança do consumidor são as microbiológicas e as relacionadas a seu potencial antioxidante (HRAS et al., 2000).

A contaminação microbiológica de alimentos gera alterações químicas e biológicas que ocasionam a degradação dos seus nutrientes ou lhes conferem propriedades desagradáveis, podendo ser evitadas pela adição de compostos denominados conservantes (FREITAS, 2000).

Os antioxidantes são necessários para prolongar o tempo de vida dos gêneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação (previnem a rancidez

nos alimentos que contêm gorduras e evitam o escurecimento nos alimentos produzidos com frutas) (AUL et al., 2011).

Apesar da utilização e importância da inserção desses agentes químicos nos alimentos, obtém-se alguns meios de segurança, onde é importante não exceder frequentemente durante a Ingestão Diária Aceitável (IDA) o limite proposto do aditivo, pois os mesmos são seguros desde que sejam utilizados dentro dos limites especificados pela legislação (VASCONCELOS et al., 2010).

### 2.1.1 Conservantes

Há décadas estão presentes em nossa dieta os conservantes alimentares, com finalidade de aumentar a vida útil dos alimentos, inibindo ou retardando as ações provocadas por microrganismos ou enzimas. Isso proporciona a manutenção dos alimentos com uma qualidade adequada e os tornam próprios para o consumo durante mais tempo, eles podem ser químicos e/ou naturais (MARTIN, 2011).

O homem busca, desde os primórdios, formas de preservar alguns alimentos para armazenamento e ingestão segura posterior. O primeiro antimicrobiano utilizado foi o cloreto de sódio (sal de cozinha), utilizado atualmente na técnica da salga (YANG, 2009).

Alguns alimentos podem ser conservados por meio da utilização de baixos pHs, técnica em que se utilizam ácidos orgânicos. Esses ácidos são caracterizados por uma cadeia carbônica ligada diretamente a uma carboxila (COOH), como o ácido acético, benzóico, sórbico e propanóico (FIORUCCI et al., 2002).

Para controlar os microrganismos de sucos, vinhos e frutas secas são utilizados dióxido de enxofre e sulfitos. Já para a conservação de embutidos e carnes cruas são utilizados nitratos e nitritos. No entanto, devem ser controladas as quantidades inseridas nos alimentos, pois esses aditivos quando em excesso possuem caráter carcinogênico (LEVINGER, 2005).

Outro conservante químico utilizado em alimentos é o ácido benzóico que exibe efeito inibitório no crescimento de fungos e leveduras e em menor escala, de bactérias, mais frequentemente associadas a problemas de contaminação em produtos com faixas de pH acima de 4.5 (THERON et al., 2009).



Assim como seus sais, benzoatos de Na e K, estão entre os conservantes mais utilizados para inibir o crescimento microbiano, em função da relação custo-benefício, podendo ser utilizados em concentrações de 0,05% a 0,1 % (SANTOS, 2012).

Quando em excesso, os conservantes químicos podem ocasionar reações adversas e até morte em consumidores sensíveis, como é o caso dos sais de sulfito e por isso há obrigatoriedade de sua discriminação, em rótulos e/ou embalagens, quanto a sua presença e quantidade (ROCHA, 2003).

Os conservantes naturais se destacam por apresentarem em seu estado natural ação antimicrobiana, possuindo em sua composição diferentes compostos que atuam como agentes conservantes (SOUZA et al., 2012).

As substâncias de origem vegetal, são atrativas aos consumidores e podem ser obtidas a partir de óleos voláteis, sementes, flores, folhas, cascas, frutos, madeira e raízes de plantas. Estas matérias-primas são sujeitas a métodos de extração, como a destilação a vapor ou fluídos supercríticos, que permitem uma maior solubilidade e melhor taxa de extração; o controle de parâmetros, como a temperatura e a pressão, permite extrair os diversos componentes isoladamente (PROBST, 2012).

A ação dos conservantes é, sobretudo, exercida ao nível da membrana celular do microrganismo, provocando danos funcionais e estruturais. As substâncias ativas das plantas são capazes de alterar a estrutura fosfolipídica da membrana celular, interrompendo o sistema enzimático, comprometendo o material genético do microrganismo formando compostos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio (THERON et al., 2009).

A utilização de óleos essenciais de condimentos para a conservação de alimentos vem crescendo devido ao interesse em substituir compostos químicos sintéticos por substâncias naturais. Outro fator é que muitos microrganismos patogênicos adquirem resistência aos antibióticos, havendo a necessidade de serem substituídos por produtos de origem natural (SARTORATTO et al., 2004).

A escolha de um agente antimicrobiano deve estar baseada em um conhecimento que esteja relacionado a substância química e propriedades físicas do alimento, as condições de armazenamento e controle, e a garantia de uma alta qualidade inicial do alimento preservado (POMINI, 2009; NASCIMENTO, 2010).

### 2.1.2 Antioxidantes

Considera-se radical livre qualquer átomo ou molécula, com existência independente, apresentando em sua estrutura atômica um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, atribuindo maior reatividade em relação as espécies não radicalares. Essas moléculas são produzidas em situações patológicas ou fisiológicas por mecanismos diferentes, como na respiração celular, e reações de oxidação, podendo ser danosa as células quando produzidas em excesso (GUTIERREZ et al., 2002).

Esses radicais são altamente ativos que uma vez formados, ligam-se a diferentes compostos em fração de segundos. Ao fazê-lo, eles podem transferir seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula a fim de se estabilizar, formando um par de elétron para uma nova ligação covalente (SOARES et al., 2005).

As substâncias antioxidantes são conhecidas por inibirem e/ou diminuírem os efeitos provocados pelos radicais livres e compostos oxidantes em extratos oxidáveis. Essas substâncias podem ser enzimáticas, como as glutathione peroxidase, catalase, e superóxido dismutases, ou não enzimáticas, como a  $\alpha$ -tocoferol, ascórbico),  $\beta$ -caroteno e os compostos fenólicos (FRANKEL; FINLEY, 2008).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação como primários ou secundários, embora algumas substâncias apresentem mais de um mecanismo e sejam classificados como múltiplas funções (REISCHE et al., 2002). No processo primário os compostos são capazes de doar um átomo de hidrogênio ou elétrons transformando os radicais livres em substâncias estáveis, e assim, inibe ou retarda o processo oxidativo. No processo secundário os compostos têm a função de inativar e bloquear os peróxidos e hidroperóxidos em espécies não radicalares, complexação de metais ou absorção de radiação ultravioleta como as vitaminas A, C e E (CHEN et al., 2011).

A substância antioxidante é selecionada para uso devido a características de doar átomos de hidrogênio ou elétrons ao radical, apresentar propriedades de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo e apresentar uma estrutura estável após a reação com o radical livre (JARDINI, 2005).

O uso de antioxidantes no Brasil é monitorado e controlado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), através da RDC nº 8, de 06 de março de 2013, limitando as concentrações máxima dessas substâncias sintéticas para uso de 0,15g/100g ao  $\alpha$ -tocoferol e 0,02g/100g para TBHQ, BHT, BHA e PG e (BRASIL, 2013).

A ingestão de antioxidantes presente em alguns alimentos e bebidas, ajuda o organismo a combater o excesso de radicais livres. Alguns compostos presentes em frutas e vegetais possuem antioxidante como as vitaminas ( $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e ácido ascórbico) clorofilina, curcumina, flavonóides e alguns óleos essenciais (AKASHI et al, 2005).

Nos alimentos, a presença de radicais livres causam a peroxidação lipídica que levam a degradação de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais presente nos alimentos, ocasionando assim, o aparecimento de odores e sabores desagradáveis, tornando-os na maioria das vezes impróprios para o consumo, diminuindo a vida útil, alterando a integridade, segurança e qualidade nutricional do produto (RAMALHO; JORGE, 2006).

Na indústria alimentícia substâncias antioxidantes são adicionadas nos produtos tendo por finalidade controlar os radicais livres que provocam a oxidação lipídica de óleos e gorduras. Entre essas substâncias as mais utilizadas são as sintéticas butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG), porém estudos realizados com a toxicologia desses elementos tem demonstrado a possibilidade de eles apresentarem efeito carcinogênico (FRANKEL; FINLEY, 2008).

Considerando crescente o interesse dos consumidores por produtos mais saudáveis com maiores valores funcionais e nutricionais, é que algumas indústrias de alimentos têm optado pelo uso de antioxidantes naturais como ervas, especiarias e suas frações isoladas em substituição parcial ou total de substâncias sintéticas (SHIMANO, 2012).

Em relação a esse cenário, a identificação de novas fontes naturais e isolamento de compostos vegetais de sementes, raízes, flores, folhas, frutos têm sido observadas em trabalhos de diversos pesquisadores nos últimos anos. Os antioxidantes naturais encontrados em plantas e frutas através de metabólitos secundários, estão relacionados com a presença de terpenos, compostos fenólicos e alguns ácidos graxos (NAKATANI, 1997; RACANICCI et al., 2004; PINO, 2009; SHIMANO, 2012).

## 2.2 DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS

A deterioração de alimentos causada por microrganismos ocorre por parâmetros intrínsecos, como pH e atividade de água, com crescimento microbiano e extrínseco que é influenciado pela temperatura, umidade e os nutrientes presentes no meio, sendo preocupante nas indústrias de alimentos (SETTANNI, CORSETTI, 2008).

Alimentos ricos em proteínas, vitaminas e aminoácidos são mais susceptíveis a esse tipo de deterioração. A oxidação dos lipídios é outro fator que leva a deterioração perda da qualidade, quando estes são expostos a fatores ambientais como oxigênio, luz e temperatura. A oxidação começa e produz compostos indesejáveis, ocasionando os sabores e odores rançosos e perda de coloração (HRAS et al., 2000).

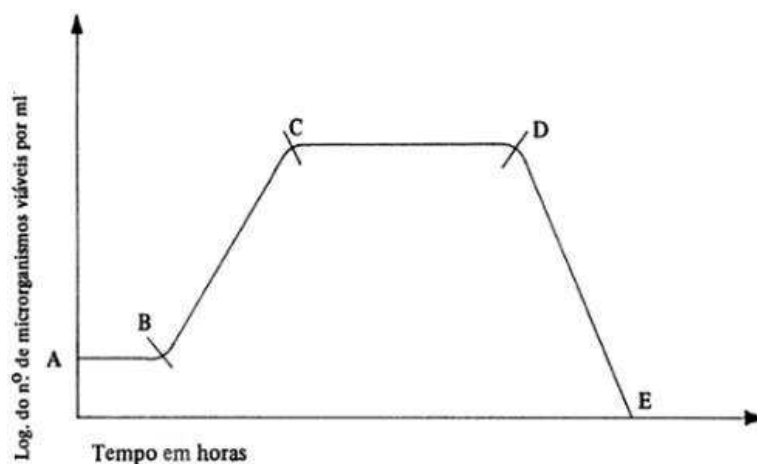
### 2.2.1 Microrganismos

Os microrganismos podem estar presentes no ar, no solo, na poeira, na água, nos objetos entre outros e é constituído pelo grupo de bactérias, fungos, protozoários, algas e vírus (MACHADO, 2005).

Os microrganismos encontrados em alimentos podem ser classificados em três categorias. Os deterioradores que promovem alterações químicas comprometendo a qualidade do alimento. Geralmente, a deterioração está associada a alterações sensoriais (aparência, odor, sabor, textura), resultantes da atividade metabólica dos microrganismos, que utilizam compostos dos alimentos como fonte de energia (APHA, 2001).

Os patogênicos promovem o desenvolvimento de infecções ou intoxicações no indivíduo que consumir o alimento contaminado, devido a produção de toxinas. Ainda existem os que promovem reações químicas específicas, produzindo alterações desejáveis em alimentos, modificando suas características sensoriais; é o caso dos microrganismos utilizados na produção de alimentos fermentados, como queijos, vinhos e pães, entre outros (FORSYTHE, 2005).

Quando os microrganismos encontram um alimento em condições favoráveis para multiplicação e crescimento passam por uma série de fases suscetíveis (MADIGAN et al., 2010). Segundo Gava (2007), se realizar contagens microbianas periódicas e representar colocando o logaritmo do número de microrganismos viáveis por mL na ordenada e a unidade de tempo na abcissa teremos uma curva de crescimento bastante semelhante representada na Figura 1.



**Figura 1 - Curva de crescimento dos microrganismos**

**Fonte: Adaptado de GAVA, 2007**

A Figura 1 mostra a curva de crescimento microbiano e as fases são:

- 1) Fase de latência (AB) é a fase estacionária, onde a célula procura se adaptar ao novo meio, portanto não ocorre crescimento e pode diminuir a concentração de microrganismos presente. O tempo de duração desta fase depende da idade da cultura usada como inóculo, quantidade de inóculo, tempo de geração, tipo de microrganismo, meio ambiente (pH, oxigênio, temperatura, entre outros fatores).
- 2) Fase logarítmica (BC), conhecida também como fase log, nesse momento o ritmo de crescimento é máximo e constante. Esta fase chega ao final pela escassez de nutrientes e produção de metabólitos tóxicos ao próprio microrganismo.
- 3) Fase estacionária (CD) – o número de células permanece constante.
- 4) Fase de destruição (DE) - é o período onde o número de células viáveis decresce em ritmo constante devido as condições adversas do meio.

Segundo Assis (2007), para conservação do alimento é importante prolongar a fase de latência que pode ser das seguintes formas: reduzir o número de microrganismos que chegam até o alimento, fazendo com que o grau de contaminação seja reduzido, pois quanto menos microrganismos existirem, maior será a fase de latência. Deve ser criadas condições ambientais desfavoráveis em relação ao pH, temperatura e umidade, isso fará com que retarde o início do desenvolvimento microbiológico (ASSIS, 2007; GEITENES et al., 2013).

### 2.2.1.1 *Aspergillus niger*

A presença de fungos em alimentos gera uma grande preocupação para a saúde pública, pois os mesmos são responsáveis pela produção de micotoxinas, que ocorrem através de metabólitos secundários dos fungos e podem estar presentes em alimentos e vegetais. Sua toxicidade atinge seres humanos e animais, e inclui efeitos teratogênicos, neurotóxicos, imunossupressores e nefrotóxicos (PERRONE et al., 2007).

A ingestão contínua de micotoxinas presente nos alimentos, mesmo que em pequenas dosagens podem acumular no organismo e acarretar sérios danos à saúde. As principais micotoxinas são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (BRASIL, 2009).

De acordo com Martins et al. (2005), a espécie de *Aspergillus* são os mais comuns dos fungos filamentosos e os mais estudados. Tem ampla distribuição e estão presentes na água e no ar, em organismos vegetais e animais, e estão associados a deterioração de alimentos e materiais vegetais.

Muitas espécies de *Aspergillus* são utilizados para obtenção de enzimas, na transformação de compostos e na biossíntese química. Mas, também possuem as patogênicas para o homem e os animais sendo que alguns possuem metabólicos tóxicos durante seu metabolismo (ROSA et al., 2002).

Estes fungos são conhecidos pela sua morfologia filamentosa e conhecido como mofo-negro. Suas colônias se apresentam nas cores brancas e amarelo pálido, mas rapidamente formar milhares de esporos (PRADO, 2002).

O *Aspergillus niger* é a terceira espécie mais comum de *Aspergillus* que estão associados com doenças humanas. Caracteriza-se por desenvolver colônias em menos de sete dias, apresentando no início aspecto de camurça branca ou amarelada mas que rapidamente fica coberta por uma densa camada de cabeças conidiais negras (MARTINS et al., 2005). É um fungo que pode causar doenças em plantas, animais e seres humanos. Os sintomas desta infecção rara em seres humanos dependem do local da infecção. Em plantas, aparece como um bolor negro sobre o fruto ou o vegetal. Também podem ser encontrados, onde há decomposição da vegetação (MENDONÇA et al., 2009).



**Figura 2 – Aspecto do *Aspergillus Niger***

### 2.3 ÓLEO ESSENCIAL

Para garantia da segurança, conservação e qualidade nutricional de um alimento, tem-se buscado diferentes aditivos naturais que sejam capazes de atender a essas demandas, sejam utilizados individualmente ou em combinação com outra tecnologia ou substância. Portanto, esses agentes devem possuir compatibilidade química e sensorial com o alimento alvo, apresentando efetividade e segurança, dentre outras características desejadas (SETTANNI et al., 2008).

Os óleos essenciais possuem várias e diferentes atividades farmacológicas conhecidas, tanto na medicina popular ou em pesquisas científicas. Sendo estas, a ação antiespasmódica, caminativa, estimulantes sobre secreções do aparelho digestivo, cardiovascular, irritante tópica ou revulsiva, secretolítica, sobre o sistema nervoso central, analgésica local, anti-inflamatória, antisséptica, inseticida, antimicrobiana, (inibindo ou retardando o crescimento de fungos e bactérias) (SIMÕES et al., 2001).

Na defesa contra microrganismos os óleos essenciais apresentam de acordo com pesquisas científicas, 60 % de propriedades antifúngica e 35 % antibacteriana, sendo os compostos fenólicos e terpenóides responsáveis pelo potencial relevante de inibição do crescimento de microrganismos, sendo esses componentes encontrados em maiores concentrações nas ervas e temperos (SOUZA et al., 2003).

Óleos essenciais resultam do metabolismo secundário das plantas, que são formados em células ou grupos de células especializadas, normalmente encontradas nos caules e folhas. Sua composição química varia significativamente com diversos fatores, desde o cultivo da planta até o método de extração (HILI, 1997).

Segundo a Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado).

Conforme a *International Standard Organization* (ISO), os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente (SIMÕES, et al., 2003). Sua composição varia de 20 a 60 compostos dependendo da planta, porém, possuem na maioria das vezes de 2 a 3 componentes em concentrações mais elevadas denominados majoritários (BAKKALI et al., 2008).

Os principais terpenos existentes nos óleos provenientes das plantas são: os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Porém os terpenos mais frequentes nos OE são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (SIMÕES, et al., 2004).

Os monoterpenos atuam na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides estão ligados diretamente à origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam diferentes funções (SIMÕES, et al., 2004).

Os terpenóides no geral, são os constituintes predominantes dos óleos essenciais das plantas, mas muitos dos óleos essenciais também podem ser compostos de outros produtos químicos, os fenilpropanóides, sendo estas substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivadas biossinteticamente do ácido chiquímico (BAKKALI, et al., 2008)

Devido aos óleos essenciais possuírem propriedades aromatizantes, serem produtos naturais e biodegradáveis; apresentarem menores efeitos colaterais, baixa toxicidade, probabilidade menor de desenvolver resistência, uma vez que os metabólitos vegetais atuam por mecanismos variado; e desempenham, simultaneamente, as funções de mais que um dos seus equivalentes sintéticos, o interesse sobre eles tem aumentado nos últimos anos (MELO et al., 2002).



### 2.3.1 Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus Officinalis L.*) é uma planta nativa do mediterrâneo e pertence à família *Lamiaceae*. Apresenta porte subarborescente lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,50 m de altura, com folhas lineares, coriáceas, muito aromáticas, e pequenas flores azul claras. Possui frutos, folhas e flores que são utilizados como temperos de carnes e massas. O uso medicinal na forma de chá (infusão) é indicado para os casos de má digestão, gases no aparelho digestivo, dor de cabeça, fraqueza e memória fraca (GONÇALVES et al., 2009).

O alecrim é utilizado na indústria por apresentar óleo essencial rico em substâncias tônicas e excitantes, como estimulantes do couro cabeludo e como antiparasitário. Também possui utilidade na aromatização em perfumes e fragrâncias, e por apresentar possíveis atividades antioxidantes e preservativas, tem aumentado o interesse das indústrias farmacêuticas e alimentícia por essa planta. Seu óleo essencial é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, cineol, verbinol,  $\alpha$  – pineno, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila, canfora dentre outros compostos, considerando o 1,8 cineol e  $\alpha$  – pineno, seu componente principal (FUNKE et al., 2006).

Dentre as ações farmacológicas tem-se observado atividade hipoglicemiante, inibidor da enzima acetilcolinesterase e  $\alpha$ -amilase, (BARBOSA et al., 2006). Também foi encontrado atividade antimicrobiana sobre fungos e bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Porém, poucos estudos relatam o efeito antimicrobiano do alecrim sobre bactérias orais (NEWALL et al., 2002).

### 2.3.2 Canela da China em Cascas

Pertence à família *Lauraceae*, existindo cerca de 250 espécies, é bastante consumida dentro do grupo de especiarias. Os óleos essenciais são encontrados nas cascas e folhas, essa especiaria é obtida da parte interna da casca do tronco (casca seca, isenta de periderme e do parênquima cortical externo, proveniente do caule principal e de ramificações deste) (BRASIL, 2010).

A canela da china (*Cinnamomum cassia*), é uma árvore original da China e do Vietnã, similar a canela verdadeira (*Cinnamomum zeynalicum*). É conhecida pelo odor

aromático popular devido ao aldeído cinâmico, sendo seu sabor menos doce e levemente mucilaginoso. A droga dessa espécie vegetal é constituída da casca, deve conter no mínimo 1% de óleo essencial. O óleo essencial é constituído de, 70 a 90 % de trans-cinamaldeído (RAVINDRAN et al., 2004).

A *Cinnamomum cassia*, normalmente utilizada na medicina para tratamento natural de tosse e resfriados. Muitos autores vêm estudando sua atividade antimicrobiana, devido a ações já observadas (POZZATTI et al., 2006, SANTURIO, 2007).

### 2.3.3 Hortelã do Campo

O hortelã (*Mentha arvensis*) é uma espécie produtora de óleos essencial pertence à família Lamiceae, de grande uso em indústria de alimentos, farmacêutica e de aromas. O oleos essecial é extraído de suas folhas e inflorescência, normalmente é extraído por arraste de vapor, cuja composição química depende de fatores genéticos e ambientais, porém, normalmente seus constituintes principais são os monotorpenos como mentona, linalol, carvona e mentol, considerando o último componente predominante (GARLET, 2007).

O hortelã é rico em mentol e amplamente utilizado na área medicinal na forma de descongestionante nasal, distúrbios digestivos, parasitas intestinais, de anestésicos locais, como anti-séptico e antioxidante (DAVID, 2007).

### 2.3.4 Cravo em Folhas

O cravo da índia (*Syzygium aromaticum L.*) pertence à família *Myrtaceae*, é nativo das ilhas Moluca (arquipélago do norte da indonésia), e no Brasil é conhecido como craveiro, craveiro da índia e cravo (DELESPAUL et al., 2000).

É uma planta arbórea, perene e atinge 10 metros de altura, a sua copa tem formato piramidal, suas folhas são ovais de coloração verde brilhante. As flores são agrupadas, tipo cacho e seus botões são colhidos quando sua cor muda de verde para carmim, sendo dessecados ao sol. O fruto é do tipo baga e de formato alongado (NAGRAES, 2003).

O cravo é utilizado como condimento na culinária, devido a seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto principal, o eugenol, sendo a ele atribuído a atividade antimicrobiana e antioxidante, por isso alguns trabalhos sugerem o uso do óleo como conservante natural (RAINA et al., 2001).

Além, do eugenol, as demais composições são: acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis (MAU et al., 2001).

O óleo essencial obtido do cravo da Índia é empregado em produtos com várias finalidades, incluindo produtos para higiene bucal, analgésico, ação antisséptica, anticarcinogênica, antibacteriana, antifúngica, antialérgica, inseticida e mutagênica (CHONG, 1997; JUNIOR, 2011).

#### 2.3.5 Tomilho Branco

O tomilho (*Thymus vulgaris*) é uma planta da família *Lamiaceae*, possui 150 gêneros, com aproximadamente 2800 espécies distribuídas pelo mundo, com mais predominância na região do Mediterrâneo (JAKIEMIU, 2008).

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* é normalmente obtido por hidrodestilação, sendo os monoterpenos que contituem os principais componentes encontrados. Os principais fitoconstituíntes existentes são carvacrol, timol, p-cimeno, 1,8 cineol, linalol e borneol. Destacando-se entre esses o timol, que possui um amplo espectro de ação antifúngica e outras propriedades farmacológicas. Além de uso medicinal a indústria alimentícia tem demonstrado interesse no uso de tomilho como aditivo natural (SANTURIO, 2007).

#### 2.3.6 Orégano

O orégano (*Origanum vulgare*) pertence à família *Lamiaceae*, possui cerca de 40 espécies conhecidas, é nativa do Mediterrâneo e euro-siberianas, cultivado no Brasil como condimento de uso culinário. Possui característica de crescimento na forma de um tufo

ramificado, apresentando folhas pequenas dispostas em espiga. Podem ser utilizadas para diferentes fins as folhas frescas ou secas (FUNKE et al., 2006)

*Origanum vulgare* é uma planta, conhecida há muito tempo, possui propriedades diaforéticas, carminativas, digestiva, antiespasmódico, anti-séptico, antitússicas, antibacteriana, antifúngica e antioxidante, pode ser utilizado ainda para tratamento de cólicas, flatulência, perda de apetite e afecções broncopulmonares (MELO et al., 2006).

Os oréganos são ricos em flavonoides, tocoferóis e derivados de ácidos fenólicos. O óleo essencial possui como componentes majoritário os compostos fenólicos, como o timol e o carvacrol, sendo estes responsáveis pelo efeito antioxidante característico (BAKKALI, et al., 2008).

A eficácia da ação antioxidante desses componentes depende de sua concentração no vegetal, que além dos fatores genéticos, são influenciados pelas condições do ambiente, entre as quais, a nutrição mineral, como verificado em hortaliças (KAHKONEN et al., 1999; MELO et al., 2006).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Química Orgânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Toledo, Paraná.

#### 3.1 Reagentes e Meio de Cultura

Foram utilizados os reagentes: DMSO - dimetilsulfóxido (Nuclear), Metanol P.A (Alphatec), Trolox - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Sigma - Aldrich) e DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Sigma - Aldrich). E os meios de cultura: Ágar Sabouraud Dextrose (Himedia) e caldo Sabouraud Dextrose (Himedia).

#### 3.2 Microrganismo

Foi utilizado para o experimento o fungo filamentosso *Aspergillus niger*, obtidos do banco de fungos da Universidade Federal do Paraná no *Campus* de Curitiba.

#### 3.3 Obtenção das amostras dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de canela da china (*Cinnamomum cassia*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tomilho branco (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), hortelã do campo (*Mentha arvensis*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram adquiridos na forma comercial em frascos âmbar lacrados, com volume de 10 mL e fabricados por Laszlo Aromaterapia LTDA ([www.laszlo.ind.br](http://www.laszlo.ind.br), Belo Horizonte, Brasil), certificada na comercialização destes produtos naturais. A empresa disponibilizou os certificados de identificação química de cada óleo contendo os cromatogramas (ANEXO A, B, C, D, E e F), realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, identificando assim, os constituintes principais responsáveis pelas várias aplicações desses óleos essenciais, sendo estes descritos na Tabela 1.

**Tabela 1 – Informações sobre os óleos essenciais utilizados e seus principais constituintes da composição química total**

Óleos Essenciais	Nome Científico	Parte da Planta	Composição Química (%)
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Ramos	1,8-cineol (41,2)
			$\alpha$ -pineno (14,3)
			canfora (11,4)
			canfeno (8,5)
			limoneno (3,2)
Canela da china	<i>Cinnamomum cassia</i>	Cascas	Aldeído cinâmico (83,9)
			Benzoato de benzila (6,8)
			$\alpha$ -pineno (1,2)
Cravo Folhas	<i>Syzygium aromaticum</i>	Folhas	Eugenol (88,5)
			Cariofileno (8,6)
			Acetato de eugenila (1,7)
Hortelã do Campo	<i>Mentha arvensis</i>	Folhas	Mentol (55,5)
			Mentona (16,7)
			Neomentol (9,3)
			Isomentol (4,9)
			Acetato de mentila (4,8)
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Folhas	carvacrol (76,5)
			timol (4,3)
			p-cimeno (4,0)
			$\gamma$ -terpineno (3,2)
			limoneno (1,4)
			canfora (0,7)
			1,8 cineol (0,7)
			$\alpha$ -pineno (0,5)
Tomilho Branco	<i>Thymus vulgaris</i>	Folhas	Timol (46,6)
			p-cimeno (38,9)
			linalool (3,8)
			$\alpha$ -pineno (3,3)
			Mirceno(1,7)
			1,8 cineol (1,2)

### 3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

#### 3.4.1 Preparo do Inóculo

De acordo com a normativa NCCLS M 38- A (2002), os fungos foram cultivados em tubos de ensaio no meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA) incubados em estufa de 5 a 7 dias a 25 °C. As colônias foram recobertas e homogeneizadas com 10 mL de solução salina estéril a 0,85 %. Os conídios e hifas foram transferidos com auxílio de pipeta estéril para tubos estéreis e deixados em repouso de 3 a 5 minutos até a sedimentação, o sobrenadante foi removido e transferido para outro tubo estéril. Posteriormente, foi realizado a leitura dos esporos em câmara de Neubauer, o resultado foi verificado e ajustado de acordo com a concentração necessária de  $5 \times 10^5$  UFC/mL para o método de microdiluição e disco-difusão (conforme Figura 3).



**Figura 3 - Preparo do inóculo *Aspergillus niger***

#### 3.4.2 Preparo dos óleos essenciais

Para o preparo das soluções dos óleos essenciais utilizados no método de microdiluição, os mesmos foram pesados (8,0 mg) e adicionados em um eppendorf estéril, dissolvidos em 1 mL de DMSO. Resultando em uma solução padrão de 8000 $\mu$ g/mL. A partir

dessa solução padrão foram realizadas as microdiluições, para obtenção de diferentes concentrações de acordo com a normativa NCCLS M 38- A (2002).

Para o método de disco-difusão os óleos foram preparados de acordo com a concentração inibitória mínima encontrada para cada óleo, sendo diluídos em DMSO.

A utilização do Dimetilsulfóxido (DMSO) no preparo das amostras em óleo, possui o propósito de diminuir a tensão superficial no contato do óleo (característica apolar) com o meio de cultura (característica polar) a fim de permitir difusão pelo ágar (PACKER & LUZ, 2007).

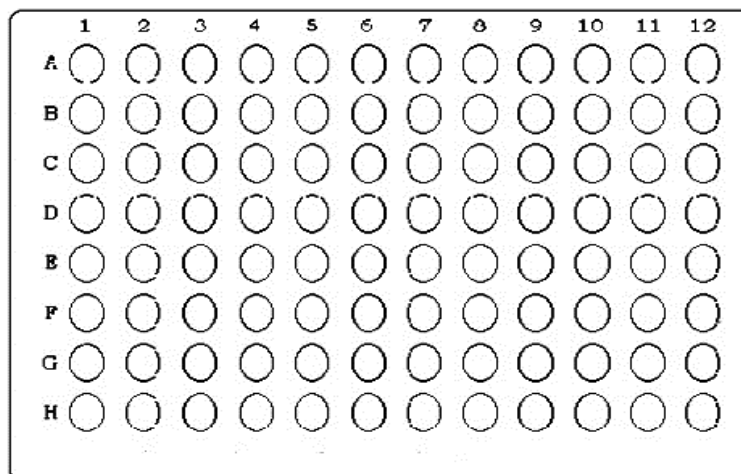
### 3.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Baseado na metodologia descrita pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002) utilizou-se o teste de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de fungos filamentosos.

Utilizou-se microplacas estéreis de múltiplos poços (96 poços) para realizar os testes de microdiluições, estes foram realizados em câmara de fluxo laminar (BIOENG09).

Primeiramente com auxílio de uma micropipeta multicanal foi adicionado em todos os poços 100 µL do caldo sabouraud dextrose. As soluções de óleo a serem testados em concentração inicial 8 mg/mL, foi adicionado através de micropipetador diretamente nos poços da primeira coluna (linha A). Posteriormente foram realizadas com o micropipetador multicanal, diluições seriadas no sentido vertical, aspirando e soltando, exceto a última coluna (linha H), assim as amostras ficaram distribuídas da mais concentrada até a menos concentrada. Em seguida, foram distribuídos 10 µL das suspensões padronizadas de fungos filamentosos a  $5 \times 10^5$  UFC em todos os poços das colunas 2, 4, 6, 8, 10, 12. As outras colunas não inoculadas foram utilizadas como controle positivo (caldo + óleo essencial). Os poços da linha H que foram utilizados para controle negativo (caldo + fungo). Utilizou-se também, um controle para verificar a esterilidade do caldo Sabouraud Dextrose e do emulsificante DMSO.





**Figura 4 – Representação da microplaca com 96 poços**

As placas de microdiluição foram incubadas a 28 °C, por aproximadamente 7 dias, porém realizou-se um acompanhamento diário do crescimento, observando a presença ou ausência de crescimento visível dos microrganismos. Os poços de controle positivo foram comparados com os poços inoculados, assim, os que apresentaram ausência de crescimento visível foi diagnosticado como a concentração mínima inibitória (CIM) em relação ao crescimento fúngico.

De acordo com a metodologia proposta por Sartoratto et al. (2004), os seguintes critérios utilizados com base no valor da CIM (concentração inibitória mínima), são: óleos com  $CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$  são considerados com forte atividade antifúngica; com  $500 \mu\text{g/mL} < CIM \leq 1500 \mu\text{g/mL}$ , possuem atividade moderada e  $CIM > 1500 \mu\text{g/mL}$ , exibem atividade antifúngica fraca.

#### 3.4.4 Disco – difusão em ágar

O método utilizado para as análises em estudo foi o disco-difusão também conhecido como método de Kirby & Bauer, utilizado para testar a suscetibilidade dos antifúngicos.

As análises foram realizadas em duplicata para cada óleo em placas de Petri estéreis com 20 mL de ágar Sabouraud Dextrose fundido e resfriado.

Após solidificação do ágar, as suspensões dos microrganismos ( $10^5$  células/mL) foram semeadas com o auxílio de swab estéril em toda a placa. Em seguida, discos antimicrobianos estéreis de 5 mm de diâmetro foram embebidos nos óleos essenciais diluídos

em DMSO nas Concentrações Inibitória Mínima dos testes de Microdiluição, com aproximadamente 10  $\mu$ L por discos.

Todos os ensaios desta etapa seguiram a padronização utilizada em Kirby e Bauer, em que as placas foram incubadas a 25°C durante 7 dias, e posteriormente realizado as leituras dos halos de inibição (em milímetros), com auxílio de um paquímetro.

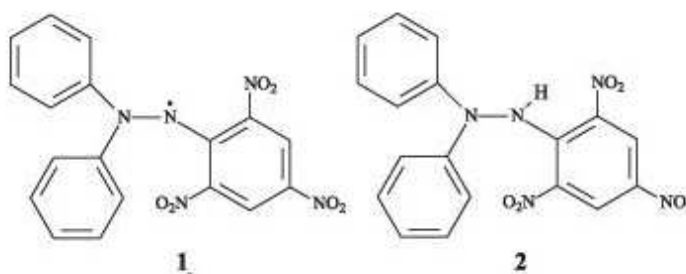
Para o controle de DMSO sobre o microrganismo estudado, foi adicionado em discos estéreis 10  $\mu$ L do emulsificante, e verificado posteriormente se houve interferência no crescimento do fungo *A.niger*.

De acordo com a metodologia proposta por Lima et al. (2006), foi considerado agente com potencial antifúngico, quando as amostras testadas produziram halos de inibição iguais ou superiores a 10 mm.

### 3.5 ANÁLISES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos pelo método de DPPH

Para determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o método pelo sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), sendo esta molécula caracterizada como uma radical livre estável em devido a sua deslocalização do elétron desemparelhado por toda molécula. Em consequência dessa deslocalização é conferido a essa molécula uma coloração violeta escuro, caracterizada por uma banda de absorção em metanol centrado a 517 nm. Este ensaio baseia-se na capacidade antioxidante de uma determinada substância sequestrar o radical DPPH, conforme Figura 5, reduzindo – o a hidrazina. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que possa doar um átomo de hidrogênio, fazendo com que dê origem a sua forma reduzida, há perda da coloração violeta para amarelo pálido (MOLYNEUX, 2004).



**Figura 5 – Forma Radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.**

As análises foram primeiramente avaliadas por espectrofotômetro, uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH é inversamente relacionada com a concentração do antioxidante testado e o tempo de reação. O método de controle mais utilizado é o declínio da absorvância no comprimento de onda observado, produzido pelo acréscimo da concentração do antioxidante a uma solução alcoólica do radical DPPH (CHEN et al., 2000).

Do ponto de vista metodológico as análises por DPPH, além de serem simplificadas, são precisas e reprodutivas para substâncias puras e vegetais, tais como flavonóides e terpenóides (BARREIROS et al., 2004; REYNERTSON et al., 2006; DAVID et al., 2007; MARXN et al., 2007; SZABO et al., 2007). Considerando essas informações, utilizou-se essa metodologia proposta por Molyneux (2004), para avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais desenvolvida no presente trabalho.

Logo, as análises foram realizadas em seis concentrações diferentes para cada óleo estudado. Pesou-se 12,5 mg de cada amostra e passou-se para balão de 50 mL dissolvido com metanol, sendo essa concentração inicial diluída proporcionalmente conforme as concentrações desejadas para um volume final de 10 mL. Todas amostras após diluição foram agitadas em agitador tipo Vortex.

Em seguida foi preparada a solução metanólica de DPPH  $3,0 \times 10^{-4}$  mol/L, em ambiente escuro foi adicionado 1 mL de DPPH em tubos de ensaio para reação com a adição de 2,5 mL da solução de cada óleo das diferentes concentrações. Como controle negativo foi preparado uma solução de 2,5 mL de metanol P.A. em 1,0 mL de DPPH  $3,0 \times 10^{-4}$  mol/L. O branco utilizado foi metanol P.A.

Os tubos de ensaio mantidos a temperatura ambiente e na ausência de luz, foram agitados, deixados em repouso por 30 minutos e então, submetidos a leitura espectrofotômetro UV/VIS (modelo T80+ PG Instruments) em 517 nm, onde a solução de DPPH obteve um máximo de absorção. Devido as diferentes concentrações dos óleos essenciais, foram realizadas 36 análises em triplicata.

Os resultados obtidos foram expressos em IC<sub>50</sub>, parâmetro este definido como índice de concentração necessária de óleo que provoca redução de 50 % de DPPH, também conhecida como concentração eficaz. Esse IC<sub>50</sub>, foi calculado através da equação da reta obtida pela curva de porcentagem de inibição, calculado pela equação 1 *versus* a concentração de cada óleo.

$$\% \text{ Inibição} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (1)$$

De acordo com a equação 1, A<sub>0</sub> é denominado como absorbância controle negativo (Metanol + DPPH) e A<sub>1</sub> é a absorbância da amostragem em solução.

Alguns autores, propõem expressar a atividade antioxidante pelo Índice de Atividade antioxidante (AAI). Determinado, por ação antioxidante fraca, moderada, forte e muito forte, considerando AAI menor 0,5; entre 0,5 e 1,0; entre 1,0 e 2,0 e superior a 2,0, respectivamente (SCHERER; GODOY, 2009). O Índice de Atividade Antioxidante (AAI) é obtido através da Equação 2.

$$\text{AAI} = \text{Concentração final de DPPH (mg/mL)} / \text{IC}_{50} \text{ (mg/ mL)} \quad (2)$$

O padrão Trolox (ácido 6-hidroxi- 2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), antioxidante sintético e hidrossolúvel similar à vitamina E, foi utilizado como controle positivo, conforme descrito por Re et al. (1999). Para o preparo da solução padrão 2,0 x 10<sup>-3</sup> mol/L, foi dissolvido num balão de 50,0 mL, 25,0 mg de Trolox em metanol P.A. Posteriormente, conforme realizado para as amostras dos óleos essenciais, determinou-se a atividade antioxidante com o padrão trolox pelo método de DPPH. Para obtenção da equação da reta, foi utilizado no eixo x as concentrações de Trolox e suas absorbâncias no eixo Y. Os resultados foram representados em TEAC, ou seja, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox, em µmol/g de amostra.

A curva padrão do DPPH foi determinada pela concentração de DPPH *versus* sua absorbância. Foram preparadas soluções metanólicas de DPPH em balões de 5 mL nas concentrações de (1 µmol/L, 10 µmol/L, 20 µmol/L, 40 µmol/L, 60 µmol/L, 80 µmol/L e 100 µmol/L), posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Foi utilizado metanol P.A como branco. Para obtenção da equação da reta, foi utilizado no eixo X as concentrações de DPPH e suas absorbâncias no eixo Y.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais

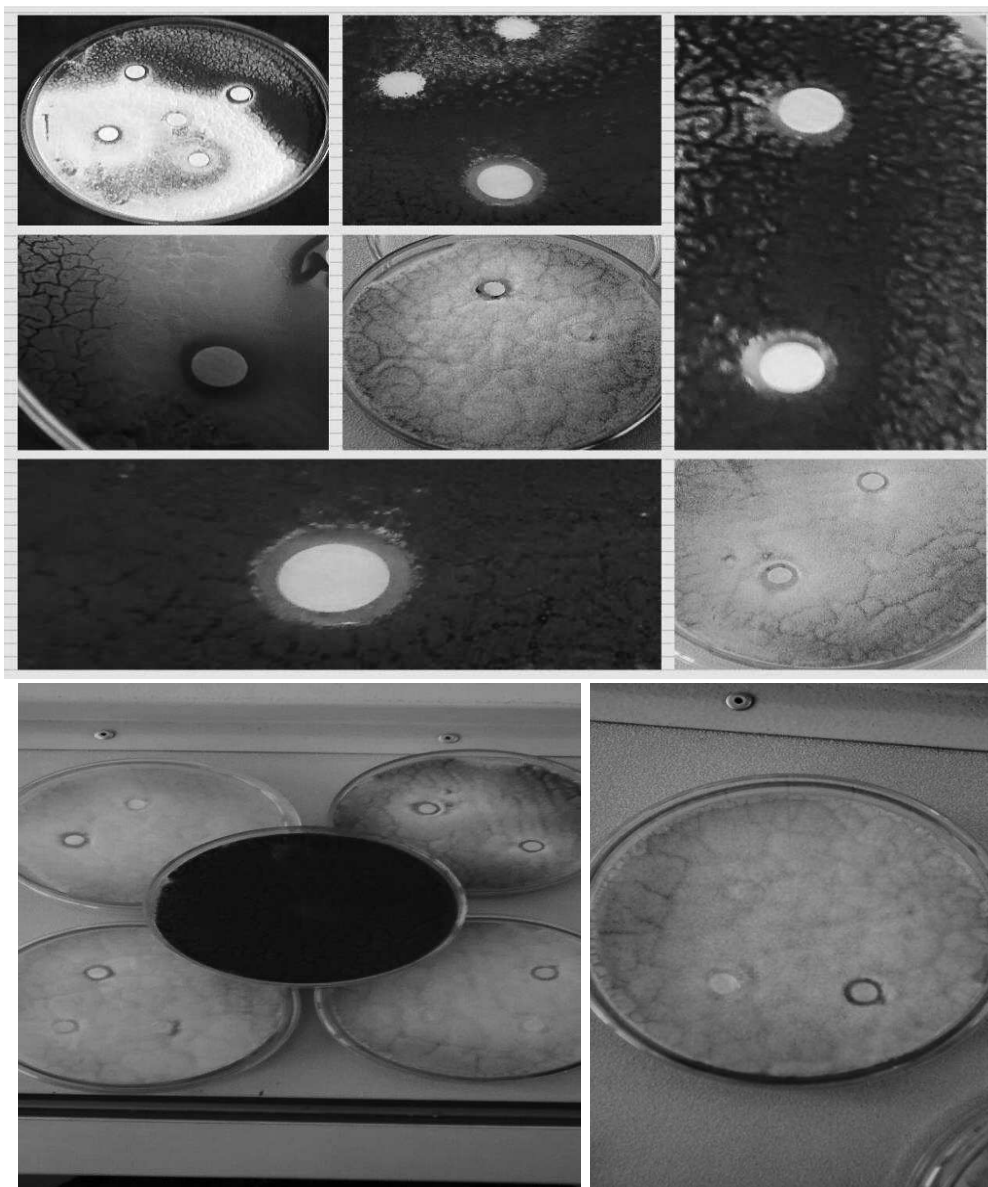
Para a quantificação da atividade antifúngica foi utilizado o método de microdiluição, permitindo identificar a concentração inibitória mínima (CIM), dos óleos essenciais. Posteriormente, de acordo com a concentração inibitória mínima foram realizados testes de disco – difusão pela técnica de Kirby e Bauer.

Os resultados obtidos pelas análises dos óleos frente ao fungo filamentosos estão dispostos na Tabela 2 e Figura 6 e 7.

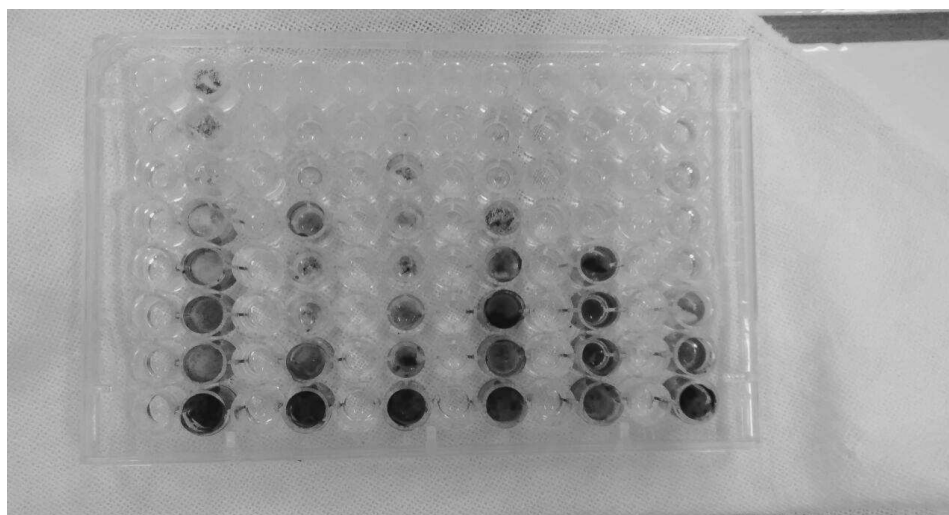
Conforme apresentado na tabela abaixo o emulsificante DMSO utilizado para diluição dos óleos essenciais não causou interferência nas análises realizadas, ou seja, não apresentou inibição antifúngica frente ao *Aspergillus niger*.

**Tabela 2 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e halos de inibição para os óleos testados contra o fungo *Aspergillus niger*.**

Óleos	CIM (µg/mL)	Halos de inibição (mm) de acordo com a CIM
Alecrim	4000	10
Canela – da – china	2000	11
Cravo – da – índia	500	13
Hortelã do campo	>8000	0
Orégano	1000	13
Tomilho branco	2000	12
DMSO	-	0



**Figura 6 - Método de disco-difusão**



**Figura 7 - Método de microdiluição**

#### 4.1.1 Hortelã do Campo

De acordo com os resultados visualizados na tabela 2, percebe-se que o óleo essencial de hortelã do campo não apresentou potencial de inibição na maior concentração testada, porém alguns autores trazem que o óleo possui atividade antifúngica. No entanto ele é aplicado em concentrações altas, tornando-se inviável para aplicação em alguns tipos de alimentos, uma vez que venha a alterar o sabor final do produto.

Singh et al. (1993) demonstraram o efeito fungicida desse óleo. Os autores usaram concentrações variando de 500 a 10.000 mg/mL de óleo de *Mentha arvensis*, e observaram inibição de 100% dos micélios, a partir de 2.000 mg/mL, o que levou a afirmar que o óleo de hortelã devido à sua atividade fungicida, pode ser utilizado como um forte produto no controle de doenças de plantas e animais.

Logo, o óleo essencial de hortelã apresenta trabalhos com efeitos antifúngicos, o que não foi comprovado neste trabalho, podendo ser atribuído a diversos fatores relacionados ao metabolismo secundário da planta, tais como: a idade da planta, a época e hora da colheita, às condições ambientais do local onde a planta se encontra, ao método de colheita e ao método de extração empregado (HILI et al., 1997).

#### 4.1.2 Cravo da China

O óleo essencial de cravo em folhas foi o mais eficaz dentro das concentrações testadas, apresentando uma concentração inibitória mínima de 500 µg/mL, tendo como halo de inibição nessa mesma concentração o tamanho de 13 mm, sendo este considerado um forte agente antifúngico.

A ação antimicrobiana do óleo da folha de cravo se deve ao composto eugenol, presente em maior quantidade (95%) da sua composição total. De acordo com Darvishi et al. (2013), o eugenol interfere como transportadores de aminoácidos aromáticos e com permeases na membrana citoplasmática das células fúngicas, alterando sua permeabilidade ou causando alterações conformacionais, levando ao rompimento celular.

Os dados obtidos sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo estão compatíveis com os obtidos por Souza et al. (2004) quando testaram a ação do óleo essencial

sobre fungos *Aspergillus niger* e obtiveram a inibição de todas as cepas, na concentração testada de 600 µg/mL.

#### 4.1.3 Orégano

Conforme dados dispostos na Tabela 2, o segundo óleo mais eficaz nas concentrações testadas foi o orégano, com CIM de 1000 µg/mL. De acordo com a metodologia disposta por Sartoratto et al (2004), possui atividade antifúngica moderada devido ao resultado obtido ( $500 \mu\text{g/mL} < \text{CIM} \leq 1500 \mu\text{g/mL}$ ).

O potencial de ação do óleo essencial de orégano se deve a seus compostos como: carvacrol em maiores quantidades, timol, terpineno e cimeno. O carvacrol e o timol pertencem ao grupo dos terpenos, e apresentam atividade inibitória contra diversas leveduras e fungos filamentosos (RHAYOUR et al., 2003).

Em pesquisa realizada por Conner & Beuchat, (2004) também encontraram CIM de 1000 µg/mL, para o óleo de orégano, evidenciando o seu poder antimicrobiano do orégano.

Estudos realizados por Mitchell et al. (2010) avaliaram o efeito inibitório *in vitro* de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano sobre o crescimento de *Aspergillus*. Observaram que perante ao fungo analisado, o óleo apresentou efeitos inibitórios significativos, lugar afetando a germinação dos esporos, o crescimento e a massa micelial, provocando alterações morfológicas. Considerando assim, que o óleo apresenta atividade antifúngica, sendo uma alternativa natural na conservação de alimentos.

#### 4.1.4 Tomilho

Os óleos de tomilho e de canela da china apresentaram as mesmas Concentrações Inibitórias Mínimas porém com diferentes halos de inibição, sendo agentes antifúngicos de potencial fraco, considerando que sua CIM > 1500. Por último, com CIM de 4000 µg/mL, o óleo essencial de alecrim, foi considerado também um agente antifúngico de potencial fraco.

Romero et al. (2009), realizaram estudos com o óleo essencial de tomilho diante de diferentes fungos patógenos, sendo um deles o *Aspergillus niger*, e atribuíram seu potencial



antifúngico a alguns de seus compostos, tendo como principal componente o timol, que apresenta capacidade em causar danos à membrana celular.

Neste trabalho, o óleo essencial de tomilho apresentou atividade antifúngica, contendo em sua composição total como componente majoritário o timol (48%), sendo este um dos responsáveis pela inibição do *Aspergillus niger*.

#### 4.1.5 Canela da China

A canela em estudo é proveniente da casca da planta, apresentando em sua composição como principal composto o cinamaldeído. Estudos relatam que este composto responsável pela ação antifúngica da planta.

Jham et al. (2005), realizaram um estudo com o objetivo de identificar o principal composto da casca da canela responsável pelo seu potencial antifúngico. Os dois fungos teste foram: *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Os resultados revelaram que o cinamaldeído é o principal composto com atividade antifúngica tanto no óleo extraído com hexano quanto no óleo destilado da casca de canela. Confirmando assim o potencial antifúngico contra o fungo filamentosos em estudo.

#### 4.1.6 Alecrim

Santoyo et al. (2005), pesquisaram sobre a ação antimicrobiana e composição química de diferentes frações de óleos essenciais de alecrim, através de análises por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massas, identificando 33 compostos. Os principais foram  $\alpha$  - pineno, 1,8 cineol, canfôra, verbenona e borneol, compondo cerca de 80% total do óleo. Relataram que devido aos constituintes principais os testes para avaliar o potencial antifúngico evidenciaram atividade contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Concretizando assim, as informações positivas das análises realizadas no presente trabalho com o óleo de Alecrim, comprovado na Tabela 3, sendo este o óleo que apresentou maior concentração de óleo para inibição total do fungo filamentosos.

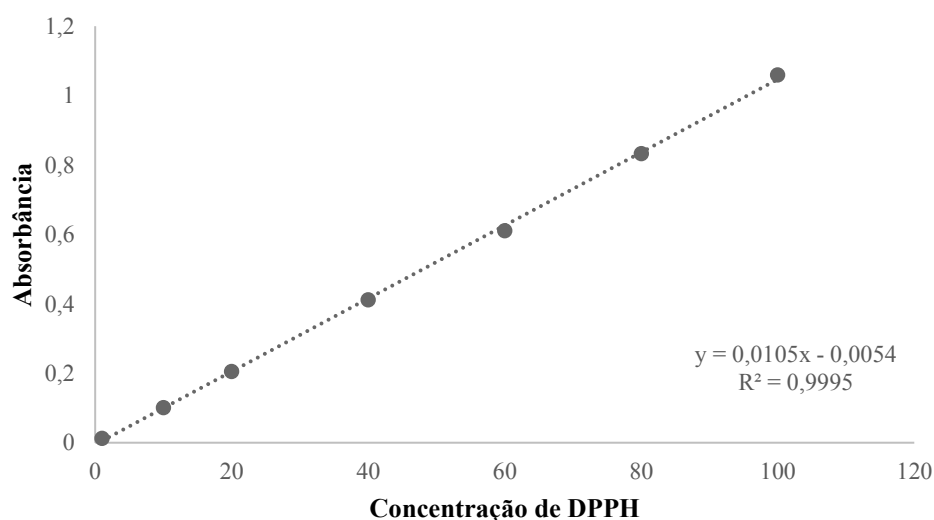
A diferença entre os resultados encontrados neste trabalho e os relatados pelos autores pode ser imposta à composição dos óleos essenciais ou as técnicas utilizadas. Neste estudo, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, com base no documento NCCLS M 38- A (2002), para determinação da concentração inibitória mínima de cada amostra.

A inexistência de uma técnica internacionalmente padronizada para avaliação voltada especificamente à óleos essenciais e extratos vegetais permite que diferentes métodos sejam utilizados, comprometendo as comparações dos resultados (VIUDA-MARTOS et al.,2008 e SMITH-PALMER et al., 1998).

#### 4.2...Determinação da atividade antioxidante dos óleos essenciais

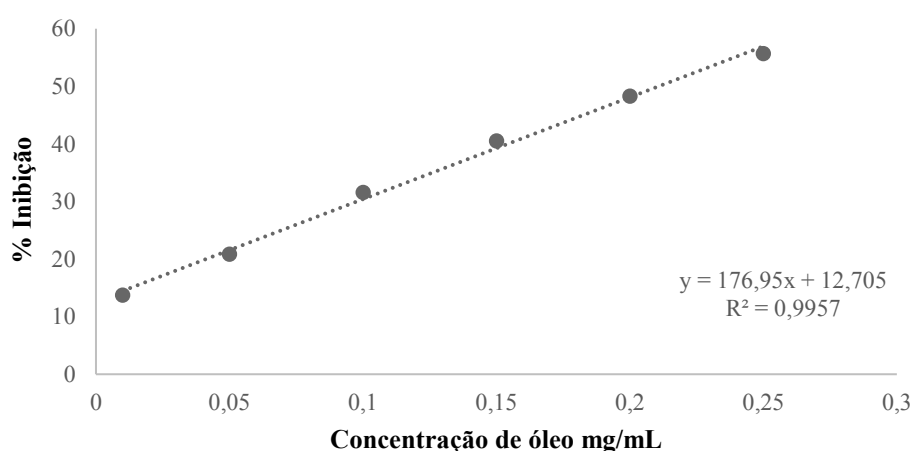
Para determinar a atividade antioxidante dos óleos essenciais, foi utilizado o método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), que em solução alcoólica é conhecido por sua coloração inicial violeta, e em reação com moléculas antioxidantes possui decréscimo na leitura de sua absorbância tendendo a coloração amarela opaca.

Os experimentos foram feitos em triplicata. Inicialmente foi realizado uma curva padrão de DPPH em solução metanólica, sendo a metodologia baseada de Molyneux (2004), com adaptações. É possível, observar abaixo na Figura 8, o gráfico da curva padrão, e identificar que de acordo com o coeficiente de determinação obteve-se uma boa linearidade.



**Figura 8– Curva Padrão de DPPH**

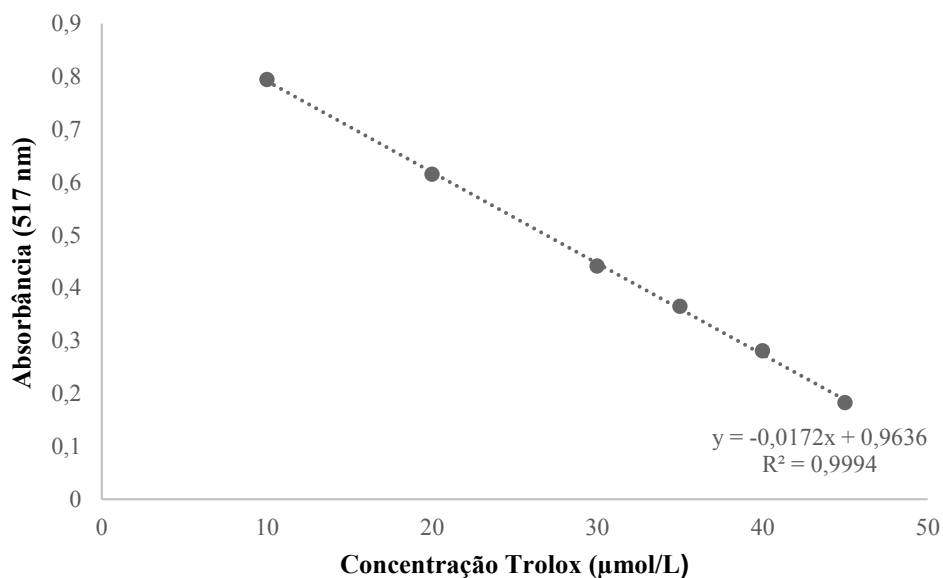
As amostras utilizadas foram os seis diferentes óleos essenciais de condimentos, realizando análises para identificar qual a melhor concentração a ser testada, considerando obter valores abaixo e acima de 50 % de inibição do DPPH, construindo assim uma boa curva linear entre a porcentagem de inibição e a concentração de cada amostra em estudo, para posterior cálculo do IC<sub>50</sub>, de acordo com a equação 1.



**Figura 9**– Exemplo de curva utilizada para a determinação da equação da reta para os óleos

Na determinação do IC<sub>50</sub> foram elaboradas curvas de calibração para cada amostra, pois o IC<sub>50</sub> deve ser calculado em intervalo de linearidade do índice DPPH. É visto que todos os óleos apresentaram concentrações diferentes na capacidade de inibição, e de acordo com a Figura 9, é possível identificar que quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o seu IC<sub>50</sub> e maior a sua atividade antioxidante, dados que variam de acordo com a concentração dos óleos.

Conforme a curva padrão identificada na Figura 10, foi utilizado o padrão Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2- ácido carboxílico) como controle positivo, conhecido por inibir os radicais livres. Assim, os resultados das análises serão expressos também em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) em  $\mu\text{mol ET}$  (Equivalente Trolox) por grama de óleo.



**Figura 10 - Curva padrão de Trolox**

Observa-se na Figura 10 que quanto maior a concentração do padrão Trolox menor será a absorbância, isso devido a sua capacidade de inibir os radicais de DPPH.

Os resultados abaixo são provenientes do cálculo do IC<sub>50</sub>, do índice de atividade antioxidante e da capacidade equivalente em trolox (TEAC).

**Tabela 3 – Valores de IC<sub>50</sub>, Índice de Atividade Antioxidante (AAI) e capacidade antioxidante em equivalente Trolox (TEAC) obtidos para cada óleo na determinação do potencial antioxidante pelo método de DPPH**

Óleos Essenciais	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	AAI	TEAC (µmol.g <sup>-1</sup> )
Alecrim	>25±0,000	< 1,20X10 <sup>-4</sup>	-
Canela da China	12,47±0,016	0,027	2,3
Cravo em Folhas	0,0078±0,010	4,32	3470,4
Hortelã do Campo	>25±0,000	< 1,20X10 <sup>-4</sup>	-
Orégano	0,21±0,010	0,160	96,60
Tomilho Branco	0,31±0,013	0,107	14,02

De acordo com os dados na Tabela 3, é possível identificar que dentre os óleos testados o alecrim e a hortelã do campo foram os menos eficazes no efeito antioxidante,

considerando que não apresentaram inibição de 50 % do radical de DPPH, mesmo testados em sua maior concentração de 25 mg/mL.

Mesmo não sendo possível calcular os valores reais para IC<sub>50</sub>, TEAC e AAI desses dois óleos, aferiu-se que ambos possuem o índice de concentração necessário para inibir 50 % de DPPH, acima de 25 mg/mL e o índice de atividade antioxidante menor que  $1,20 \times 10^{-4}$ . Diante, disto torna-se inviável o uso desses óleos como agentes antioxidantes, pois a concentração a ser utilizada será consideravelmente alta para promover a redução do radical livre.

#### 4.2.1 Alecrim

Alguns autores trazem o óleo essencial de alecrim como agente antioxidante, porém comparando a composição química a estes, percebe-se que o componente majoritário do óleo essencial de alecrim em estudo obtido comercialmente, é o 1,8 Cineol (41,2 %) e o pineno (23%) considerado este um agente oxidante, conforme Tabela 1.

Silveira (2012) cita que vários trabalhos sobre avaliação de atividade antioxidante utilizam da planta, o óleo ou o extrato, e é difícil se ter uma comparação com outras literaturas, já que o potencial antioxidante pode ser expresso de diversas formas. Confirma também que outro fator que pode contribuir para essa dificuldade são as modificações introduzidas nas metodologias, tais como os volumes adicionadas das soluções de extrato e/ou de radicais livres.

Segundo estudo realizado por Ramalho (2005), onde realizou um comparativo de várias pesquisas já realizadas sobre extração e atividade antioxidante dos óleos essenciais de Alecrim, obteve como compostos responsáveis pelo potencial antioxidante diterpenos fenólicos, como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, e outros ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico, considerando que estes não estão presentes no óleo avaliado.

Segundo alguns pesquisadores, as diferenças observadas na composição dos extratos comerciais derivam das condições de extração aplicadas, nas quais o ácido carnósico, principal diterpeno fenólico do alecrim fresco, pode ser degradado em diferente extensão, sendo convertido em carnosol ou outros diterpenos (SCHWARZ et al., 2001).

Na extração por CO<sub>2</sub>, o ácido carnósico é o principal diterpeno do extrato, enquanto a extração com uso de solventes orgânicos resulta em uma considerável redução no conteúdo de ácido carnósico, favorecendo a permanência, geralmente, de carnosol como diterpeno mais abundante depois do ácido carnósico (RAMALHO, 2005).

#### 4.2.2 Hortelã do Campo

O óleo essencial de Hortelã do campo, foi extraído por arraste a vapor, e possui composição identificada na Tabela 1. Embora, pertença a família *Lamiaceae*, que é considerada forte em agentes antioxidantes, devido a seus compostos fenólicos. O estudo realizado por Hu et al (2006), também não apresentou capacidade de reduzir o radical DPPH em concentrações menores que 25 mg/mL.

Watanabe et al (2006), testando os métodos de extração por arraste a vapor e por solvente etanol em hortelã do campo, obtiveram melhores resultados com o segundo método.

Considera-se assim, que o método de extração tem influência na composição química dos óleos essenciais, que segundo Henandéz-Hernandéz (2009), a atividade antioxidante desses condimentos não depende somente de compostos fenólicos, mas também da metodologia de extração e do solvente.

Pesquisas realizadas pelo método de extração por hidrodestilação, avaliam que a quantidade de flavonóides pode variar conforme a procedência das amostras (fatores ambientais, época de coleta, secagem e armazenamento) e os solventes utilizados no processo de extração, bem como suas concentrações (ANDRADE et al., 2000; SKOULA et al., 2000; CARVALHO-FILHO et al., 2006; PAPAGEORGIOU et al., 2008).

#### 4.2.3 Cravo da China

De acordo, com a Tabela 3, o óleo essencial de cravo foi que apresentou maior potencial antioxidante, apresentando um IC<sub>50</sub> de 0,0078 mg/mL, e AAI 4,32, sendo classificado como antioxidante de ação muito forte.

O óleo essencial de cravo em folhas apresentou essa ação antioxidante provavelmente devido ao elevado teor de eugenol na composição, pois segundo Scherer & Godoy (2009) o eugenol apresenta valor de AAI entre 10 e 11. A ação desse composto está relacionada a sua estrutura química, sendo o anel fenólico que permite a doação de um próton ( $H^+$ ) ao radical livre, estabilizando e interrompendo o mecanismo de oxidação do mesmo (RAMALHO; JORGE, 2006).

Scherer et al. (2009), obteve em seu estudo o mesmo valor de  $IC_{50}$  apresentado na Tabela 3, para o óleo essencial de cravo, que também foi adquirido comercialmente, porém com concentração diferenciada de eugenol (83,75%), sendo este um composto fenólico de forte ação antioxidante.

Referente aos valores de capacidade antioxidante equivalente ao padrão Trolox, observa-se que quanto menor o  $IC_{50}$ , maior é a concentração de TEAC. Dentre os óleos avaliados, o óleo essencial de cravo apresentou a maior concentração (3470,4  $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ ).

#### 4.2.4 Orégano

O óleo essencial de orégano foi o segundo mais eficaz na inibição dos radicais livres ( $IC_{50}$ : 0,21 mg/mL, AAI: 0,160), classificado como ação antioxidante fraca, por apresentar AAI inferior a 0,5, conforme descrito na metodologia.

Esse resultado obtido é superior ao encontrado por Ribeiro (2015), que também obteve o óleo essencial desse condimento comercialmente, resultando em um  $IC_{50}$  de 0,42 mg/mL. Seu potencial antioxidante se deve por apresentar em sua composição compostos fenólicos, como o carvacrol e timol, que apresentam alta ação antioxidante.

#### 4.2.5 Tomilho Branco

Conforme a Tabela 3, o óleo de Tomilho apresentou um AAI de 0,107, considerado conforme descrito na metodologia agente de ação antioxidante fraca.

O óleo essencial em estudo apresenta como principal componente o timol (45%), conhecido pelo seu potencial antioxidante. O resultado de IC<sub>50</sub> obtido (0,31 mg/mL) foi superior que o encontrado por Mancini et al. (2015) que foi de 0,065 mg/mL pelo método do DPPH, considerando que no estudo realizado pelo autor, os componentes majoritários do tomilho foram timol (77,5%) e carvacrol (9,3%), sendo o segundo componente um forte agente antioxidante.

#### 4.2.6 Canela da China

Considerando que resultados com índice de atividade antioxidante inferior a 0,5 são determinados como ação antioxidante fraca, o óleo de canela foi o que apresentou o menor potencial antioxidante com um AAI de 0,027 e IC<sub>50</sub>: 12,47 mg/mL.

Os constituintes principais presentes no óleo de canela da china deste trabalho são:  $\alpha$ -pineno (1,2%), canfeno (0,4%), p-cimeno (0,5), aldeído cinâmico (83,9%), eugenol (0,4),  $\beta$ -cariofileno (0,2%), benzoato de benzila (6,8%), são poucos os estudos relacionados na determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, por ser considerado um fraco antioxidante.

Isso se deve a extração ser proveniente da casca da planta, que traz o constituinte principal: aldeído cinâmico, sendo este responsável pelo forte cheiro e sabor da canela, com isso, vem sendo extensivamente empregado na aromatização de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos, quase sempre em concentrações inferiores a 0,5 % (RAVINDRAN et al., 2004).



## 5 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com esse trabalho permitem concluir que o óleo essencial de cravo foi o mais eficaz, apresentando maior potencial antifúngico e antioxidante, comparado aos demais óleos em estudo.

Dentre os demais óleos o de hortelã do campo não apresentou potencial antifúngico e antioxidante nas concentrações testadas. Os óleos essenciais de canela, tomilho branco e orégano apresentaram atividade antifúngica e capacidade de inibição ao radical de DPPH. O óleo de alecrim apresentou potencial antifúngico, porém, não demonstrou inibição ao radical livre nas concentrações testadas.

Os resultados positivos obtidos, principalmente os relacionados ao óleo de cravo podem abrir perspectivas no sentido de desenvolver um antimicrobiano e antioxidante eficaz, podendo ser utilizados nas indústrias alimentícias como produtos naturais na conservação de alimentos.

Entretanto, para utilização garantida desses óleos com potenciais antioxidante e antifúngico faz necessário estudos complementares *in vivo* e *in vitro* a fim de verificar a possibilidade de fazer a substituição de aditivos sintéticos por esses agentes naturais, podendo ser avaliado em trabalhos futuros.

## 6 REFERÊNCIAS

AKASHI, K.; NISHIMURA, N.; ISHIDA, Y.; YOKOTA, A. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Japan, v. 323, p. 72-78, 2005.

ANDRADE, A.M. & GOMES, S.S. Influência de alguns fatores não genéticos sobre o teor de óleo essencial em folhas de *Eucalyptus citriodora*. **Floresta e Ambiente** 27(1): 181-189, 2000.

APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, American Public Health Association. 3 ed. 2001.

ASSIS, Alexandra A. R. de. **Estudo de mycobacterium phlei (atcc 11758) como agente agregante para hematita e quartzo**. Dissertação de Mestrado ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 102 p. 2007.

AUN, M. V., MAFRA C., PHILIPPI J. C., KALIL J., AGONDI, R. C., MOTTA, A.A. Aditivos em alimentos (Food Additives). **Rev. bras. alerg. imunopatol.** – Vol. 34. Nº 5, 2011.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – **A review. Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–475, 2008.

BARBOSA, Filho J.M; Medeiros K.C.P; Diniz M.F.F.M; Batista L.M; Athayde-Filho P.F; Silva M.S; Cunha E.V.L; Almeida J.R.G.S; Quintans, Júnior L.J; Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev Bras Farmacogn** 16: 258-285. 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; Antioxidant Phenylpropanoid Esters of Triterpenes from *Dioclea lasiophylla*. **Pharm. Biol.** 42, 36, 2004.

BRASIL, F. I. As micotoxinas. **Revista Food Ingredients Brasil**. Editora Insumos Ltda. n. 7, p. 32–40, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **Anvisa. Resolução - RDC nº 8, de 06 de março de 2013**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 04 de maio 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**.5.ed. Brasília: Anvisa, 2v/il. 5 ed. 718-723, 852p 2010.

BRASIL. **Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 outubro 1997**. Aprova o regulamento técnico: aditivos alimentares – definições, classificação e emprego. Diário Oficial da União, Brasília, 28 out. 1997.

CARDOSO M.G, GAVILANES ML, MARQUES M.C.S, SHAN A.Y.K.V, SANTOS B.R, OLIVEIRA A.C.B, BERTOLUCCI S.K.V, PINTO A.P.S. Óleos Essenciais. **Boletim Técnico - Série Extensão**, 8 (58): 1-42, 2000.

CARVALHO-FILHO, J.L.S.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum L.*) essential oil. **Revista Brasileira Farmacológica**. 16(1): 24-30, 2006.

CHAVES, Lúcia da Conceição Diogo. **Estudo da Cinética de Formação de Biofilmes em Superfícies em Contato com Água Potável**. Dissertação de mestrado em Tecnologia do Ambiente pela Universidade do Minho. Braga, 186p. 2004.

CHEN, B.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Minor Components in Food Oils:A critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, London, v.51, p.901-916, 2011.

CHEN, C.; TANG, H.; SUTCLIFFE, L. H.; BELTON, P. S. Green Tea Polyphenols React with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radicals in the Bilayer of Liposomes: Direct Evidence from Electron Spin Resonance Studies. **Food Chemistry**. 48, 5710, 2000.

CHONG, B.S.; FORD, T.R.P.; KARIYAWASAM, S.P. Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. **International Endodontics Journal**, Oxford, v.30, n. 40, p. 240-249, Apr.1997.

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal Food Science**, Chicago, v. 49, p. 429-434, 2004.

DARVISHI, E. et al. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **Journal Molecules**, v. 8, n. 10, p. 1-9, 2013.

DAVID, E. F. S.; MISCHAN, M. M.; BOARO, C. S. F. Desenvolvimento e rendimento de óleo essencial de menta (*Mentha x piperita L.*) cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Revista Biotemas**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 15-26, 2007.

DAVID, J. P.; BRANDÃO, H. N.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; Giuliatti, A. M.; Branco, A.; Agra, M. de F.; Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**. p. 78, 215, 2007.

FAVERO, D.M.; RIBEIRO, C.S.G.; AQUINO A.D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v.18, n.1, p.11-20, 2011.

FIORUCCI, A. R., SOARES, M. H. F. B., CAVALHEIRO, E. T. G. Ácidos Orgânicos. **Química Nova na Escola**, n.15, 2002.

FLORES, Simone Hickmann. **Estudo da produção do bioconservante nisina por *Lactococcus lactis subsp lactis***. Tese de doutorado da Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Campinas, SP. 2000.

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

FRANKEL, E.N.; FINLEY, J.W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal na Food Chemistry**. v.56, n.13, p.4901-4908, 2008.

FREITAS, A.; FIGUEREDO, P. **Conservação de alimentos - apoio à cadeira de conservação de alimentos**. Escolar Editora, Lisboa, 2000.

FUNKE, Melzig M.F. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of  $\alpha$ -amylase activity. **Rev Bras Farmacogn** 16: 1-5. 2006.

GARLET, T. M. B. **Produtividade, teor e composição do óleo essencial de espécies de *Mentha L. (Lamiaceae)* cultivadas em hidroponia com variação de potássio**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. v. 37, n. 4, p. 956-962, 2007.

GAVA, A. J. **Princípios da Tecnologia de Alimentos**. 8 ed. São Paulo: Nobel, 2007.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P.; Modelagem do Crescimento de Bactérias Láticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e

Presunto Cozido Fatiados e Embalados à Vácuo, **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.15, n.1, 2013.

GONÇALVES, GG; MANCINELLI, RC; MORAIS, LAS. Influência do horário de corte no rendimento de óleo essencial de alfavaquinha e alecrim. **Horticultura Brasileira**: S108-S112. 2009.

GUTIERREZ, E. M. R.; REGITANO-D ARCE, M. A. B.; RAUEN-MIGUEL, A. M. O. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 22-27, 2002.

HENRIQUES, Ana Rita Barroso Cunha de Sá. **Avaliação da vida útil de refeições “cook-chill” e “cook-freeze”: indicadores microbiológicos, físico-químicos e sensoriais**. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2008.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCEALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E.; LEGARRETA, G.I. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v.81, n.2, p.410-417, 2009.

HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS, R.G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied microbiology**, v.24, p.269-275, 1997.

HILI, P.; EVANS, C.S.; VENESS, R.G. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. **Letters in Applied microbiology**. **Meat Science**, v.24, p.269-275, 1997.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbylpalmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000.

JAKIEMIU, Elizabete Aparecida Ruzza. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris L.*)**. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 89 fl, tabs 2008.

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

KÄHKÖNEN, M.P; HOPIA, A.I; VUORELA, H.J; RAUHA, J.P; PIHLAJA, K; KUJALA, T.S; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agricul. Food Chemistry*. 47:3954-3962, 1999.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. *Food Nutrition Bulletin*, v.26, p.170-178, 2005.

LIDON, F.; SILVESTRE, M. **Conservação de alimentos** - princípios e metodologias. Escolar Editora, Lisboa, 2008.

MACHADO, Sílvia Maria de Oliveira. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis**. Dissertação de mestrado em Engenharia Biológica pela Universidade do Minho. Braga, 129p. 2005.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P.; **Microbiologia de Brock**, 12ª Ed. Artmed, 2010.

MANCINI, E; SENATORE, F; MONTE, D.; MARTINO, L.; GRULOVA D.; SCOGNAMIGLIO, M.; SNOUSSI, M. FEO, V. Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris L.* Essential Oils. **Journal Molecules**. Academic Editor: Derek J. McPhee. 2015.

MARTINS, J. E. C., Melo, N. T. e Heins-Vaccari, E. M. **Atlas de Microbiologia Média**, Copyright, Editora Manole Ltda, pp. 39-45.2005.

MARXEN, K.; VANSELOW, K. H.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U.; Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear **Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements Sensors**.p. 7, 2080, 2007.

MAU, J.L; CHEN, C.P; HSIEH, P.C. Antimicrobial effects of extracts from Chinese chive, cinnamon and corn fructus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:183-188. 2001.

MEDICE, R. et al. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência Agro técnica**. Lavras, v.31, n.1, 2007.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, SP, n. 36, p. 1-11, 2002.

MELO, E.A; MACIEL, M.I.S; LIMA V.L.A.G; LEAL, F.L.L; CAETANO A.C.S; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência da Tecnologia de Alimentos**. 26:639-644, 2006.

MENDONÇA MB; HIDALGO AF; CHAVES FCM. **Isolamento e identificação de fungos com potencial patogênico para a saúde humana em material vegetal de uso medicinal comercializado em Manaus**. Horticultura Brasileira 27: S1208-S1214. 2009.

MITCHELL, T. C.; MONTENEGRO, T. L.; LEITE DE SOUZA, E.; LIMA, E.; CARMO, E. Origanum vulgare L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic Aspergilli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 755-760, 2010.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. **Science Technologia**. 26(2): 211-219. 2004.

NAGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: Condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, p. 267. 2003.

NAKATANI, N. Antioxidants from spices. In: SHAHI DI, F. Natural antioxidants: chemistry, effects and application. **The American Oil Chemest's Society**, p. 64-75. 1997.

NASCIMENTO, P. F.C., RODRIGUES, C. S., ANTONIOLLI A.R., SANTOS P. O., JÚNIOR, A. M. B. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**, V.17(1): 108-113, Jan./Mar. 2010.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos**; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NEWALL C.A; ANDERSON L.A; PHILLIPSON J.D. **Plantas medicinais: guia para profissional de saúde**. São Paulo: Premier. 2002.

ONU, **Organização das Nações Unidas**, 2013. Disponível em: <http://www.onu.org.br/com-crescimento-de-16-producao-industrial-no-brasil-se-mantem-moderada-em-2013-diz-onu/>. Acesso em 03 de março de 2014.

PACKER JF, LUZ MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn**, 17(1): 102-7, 2007.

PAPAGEORGIOU, V.; GARDELI, C.; MALLOUCHOS, A. et al. Variation of the chemical profile and antioxidant behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller grown in Greece. **Journal Agric. Food Chemistry**. 56(16): 7254–7264, 2008.

PERRONE, G.; SUSCA, A.; COZZI, G.; EHRLICH, K.; VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; MEIJER, M.; NOONIM, P.; MAHAKAMCHANAKUL, W.; SAMSON, R. A. Biodiversity of *Aspergillus spp.* in some important agricultural products. **Studies in mycology**, vol.59, n.1, p.53-66, 2007.

PINO, L.M. **Influência da ração com extratos naturais na qualidade e estabilidade oxidativa da carne de frangos**. 2009. 118p. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

POLÔNIO, M. L. T. **Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita**. 2010. 129f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente). Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

POMINI, Armando Mateus. **Acil-Homosserina Lactonas produzidas pelas bactérias fitopatogênicas *Pantoea ananatis* e *Methylobacterium mesophilicum* e Defesa Química no *Opilião Hoplobunus mexicanus***. Dissertação de Mestrado de Química Orgânica da Universidade de Campinas. Campinas/SP. 2009.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de bioprocessos em escala semipiloto para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido a partir do bagaço de mandioca**. Dissertação do mestrado de Tecnologia em Alimentos. UFPR, Curitiba, 2002.

PROBST, Isabella da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. Botucatu : [s.n.], 2012.

RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J.F.M. et al. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in precooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research Technology**, v.218, p.521-524, 2004.



RAINA, V.K et al. Essential oil composition of *Syzygium Aromaticum* leaf from little Andaman, India. **Flavour Fragrance Journal**, Chichester, v.16, n.5, p.334-336. 2001.

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

RAMALHO, Valéria Cristina. **Ação antioxidante de alfa-tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação**. São José do Rio Preto: [s.n.], 2005.

RAVINDRAN, P. N.; NIRMAL-BABU, K.; SHYLAJA, M. Introduction. In *Cinnamon and Cassia: The genus Cinnamomum* (pp. 1e13). **Fitoterapia**: CRC Press, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Orland, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

REPETTO, M.G.; LESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J Med. Biol. Res.* 35 (5): 523–34. 7.2002.

**Revista Associação Brasileira de Criadores de Camarão**. Recife, Vol. 6, n.1, p.10-18, mar. 2004.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; HUI, Y.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive Depsides and Anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Science Technologia**. 69, 1228, 2006.

RHAYOUR, K., BOUCHIKHI, T., TANTAOU-ELARAKI, A., SENDIDE, K., REMMAL, A. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 286-292, 2003.

ROMERO, A.L.; SPECIAN, V.; OLIVEIRA, R.C.; DINIZ, S.S.S. Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris L.*) contra fungos fitopatogênicos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 11,15-8, 2009.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS C. G.; BARONI, S. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de veterinária. Departamento de micologia e imunologia veterinária. Micologia veterinária. Prática 8. Seropédica. 2002.

SACHIDANANDAM, K.; FAGAN, S.C.; ERGUL A. Oxidative stress and cardiovascular disease: Antioxidants and unresolved issues. **Food Chemistry**. 23 (2): 115–32, 2005.

SANTOS, Vânia Paula Salviano. **Desenvolvimento de um método para detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. Rio de Janeiro, 98 p. 2012.

SANTOYO, S.; IBANEZ, E.; SENORANS, F.J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**. cap. 31, p. 790-795. 2005.

SANTURIO, Janio Moraes; SANTURIO, Deise Flores; POZZATTI, Patrícia Cristiane; FRANCHIN, Moraes Paulo. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella entérica de origem avícola. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.;DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. vol.35 nº.4 São Paulo Oct./Dec. 2004.

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

SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. **Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst to chromanols using HPLC**. Berlin, v. 195, p. 95-98, 2001.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 121, p. 123-138, 2008. apud MACHADO, T. F. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Embrapa Agroindustrial Tropical**, ISSN 2179-8184, 145, 2011.

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

SILVEIRA, S. M. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. Nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo frescal. **Programa de graduação em Ciência dos Alimentos**. UFSC, Florianópolis, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2003. p. 467-495.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre. Ed da Universidade UFRGS, 2001.

SINGH, S.P. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. **Fitoterapia**, Milano, v. 63, n. 1, p.76-78, 1993.

SMITH-PALMER, A. et al. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, p.118-122, 1998.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciência e Farmacologia**, São Paulo, v. 41, n. 1, 2005.

SOUZA, Evandro Leite et al. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p. 38-42, 2003.

SOUZA, S. M. C.; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência Agrotécnica**. Lavras, v. 28, n. 3, p. 685-690, maio/jun., 2004.

SZABO, M. R.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. X. ;Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61, 214, 2007.

TAKAGI, Maya. **A implantação da política de segurança alimentar e nutricional no Brasil: seus limites e desafios**. Tese de doutorado da Universidade Estadual de Campinas. Instituto da Economia. Campinas, SP.2006.

TASSOU, C.C., DROSINOS, E.H., NYCHAS, G.J.E. Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. **Journal of Food Protection**, v.59, n.1, p.31- 4, 1995.

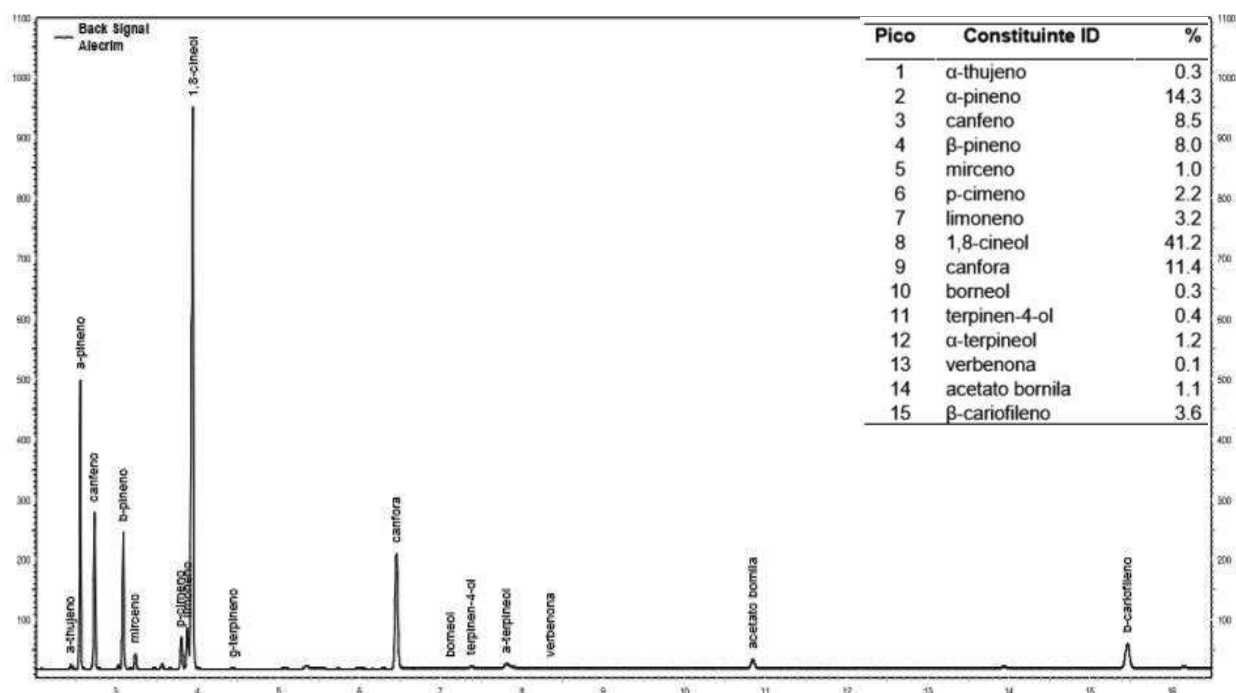
THERON, M. M.; LUES, J. F. **Organic Acids and Food Preservation**. 1 Edição. ed. Boca Raton: CRC Press, v. I, 2009. 318 p. ISBN 1420078429/9781420078428.

VASCONCELOS, M. A. S., FILHO, A. B. M.; Técnico Em Alimentos – **Conservação de Alimentos**. EDUFRPE, Recife, p. 15-29, 2010.

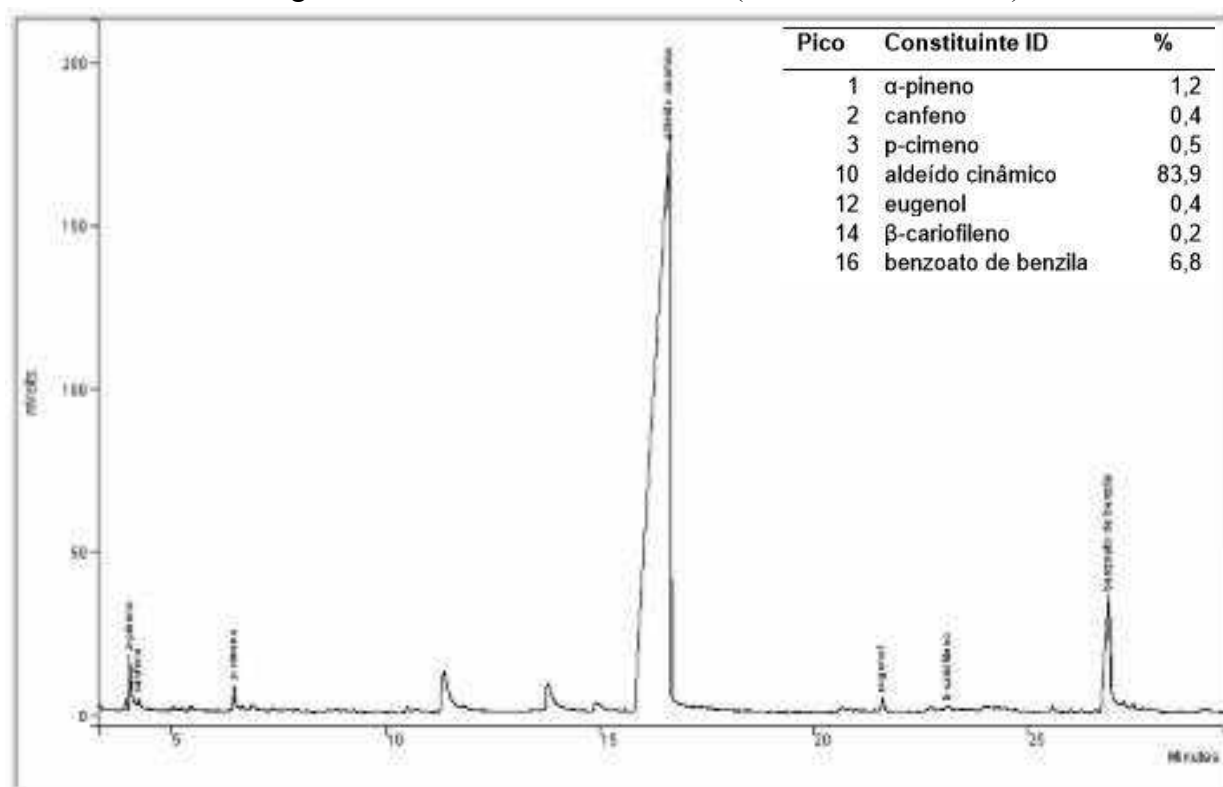
VIUDA-MARTOS, M. et al. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.526-531, 2008.

WATANABE CH; NOSSE TM; GARCIA CA; PINHEIRO POVH N. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis L.*) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 4: 76-86, 2006.

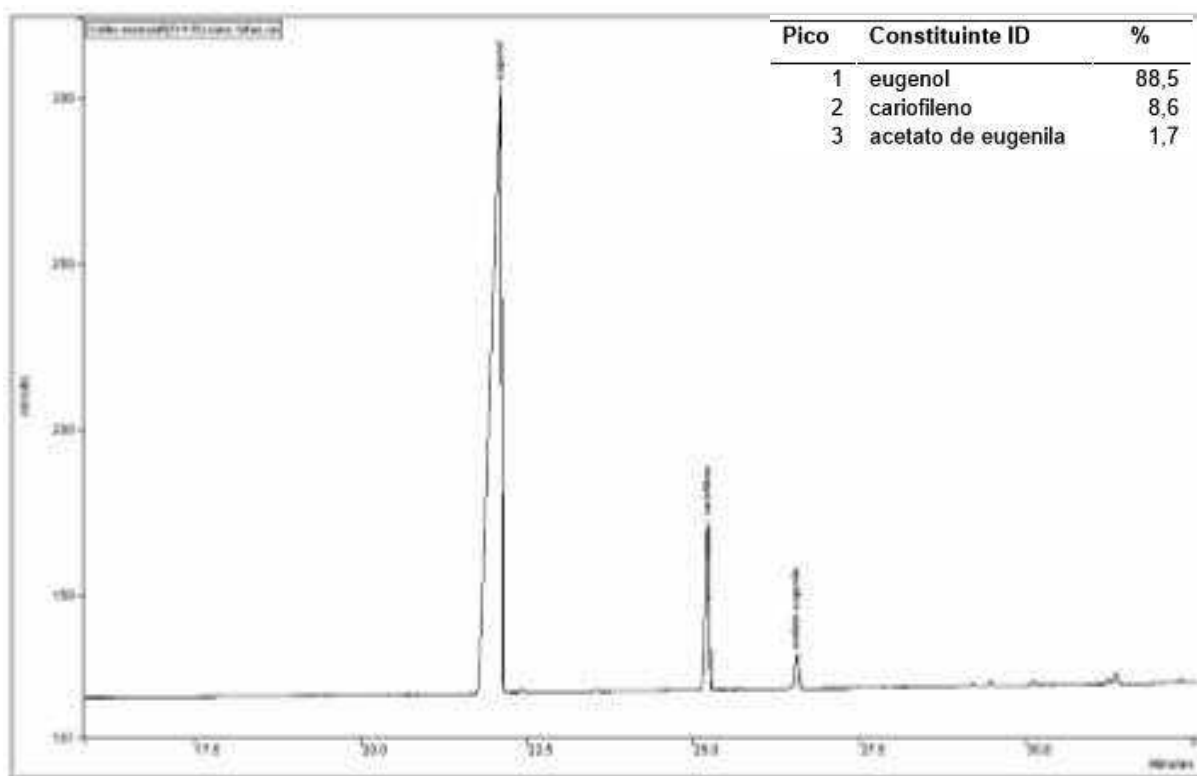
YANG, Hyun Mo. **Dinâmica populacional de microrganismos e a conservação de alimentos**. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Matemática, Estatística e Computação Científica. Campinas, SP.2009.

ANEXO A – Cromatograma do óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)


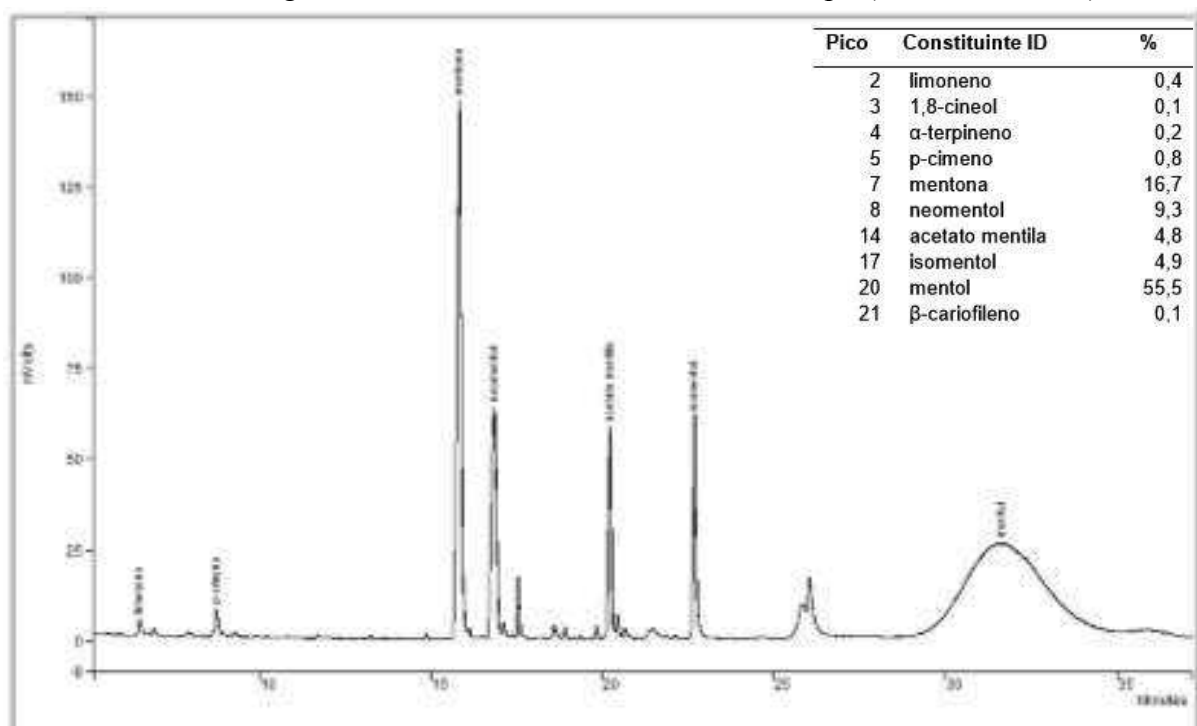
Compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução. Método de extração: destilação por arraste a vapor.

 ANEXO B – Cromatograma do óleo essencial de canela (*Cinnamomum cassia*)


Compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução. Método de extração: destilação por arraste a vapor.

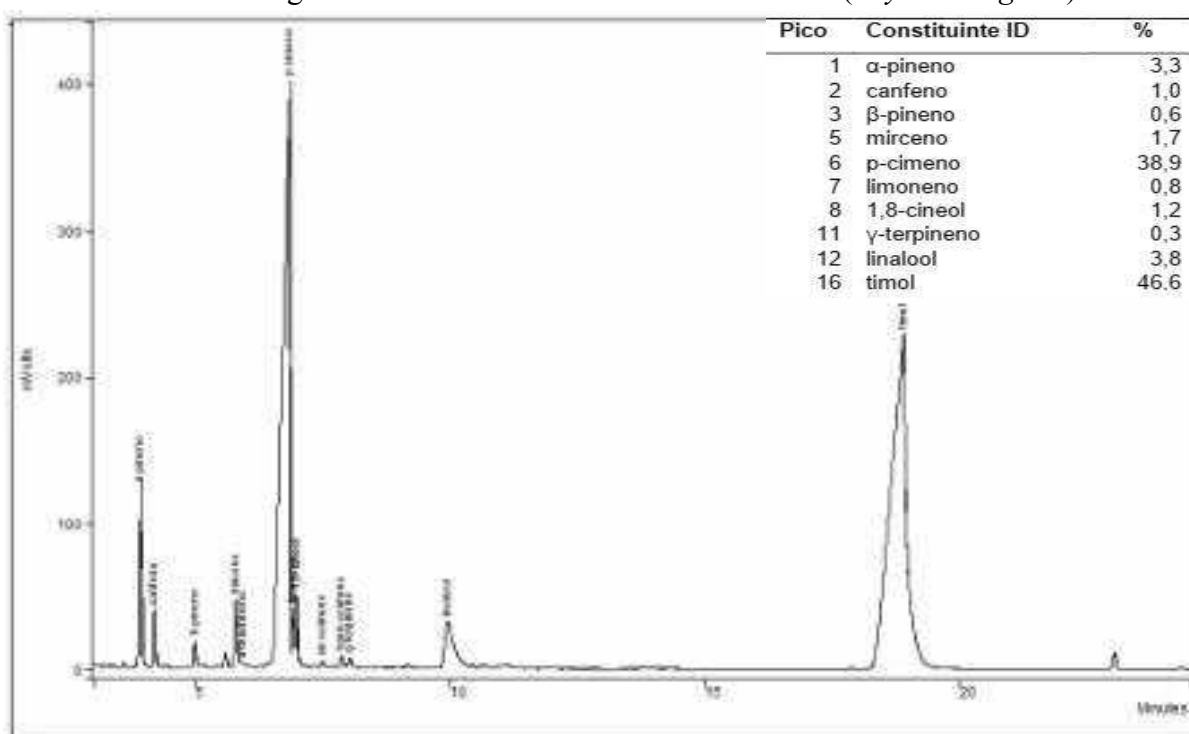
ANEXO C – Cromatograma do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*)

Compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução. Método de extração: destilação por arraste a vapor.

ANEXO D –Cromatograma do óleo essencial de hortelã do campo (*Mentha arvensis*)

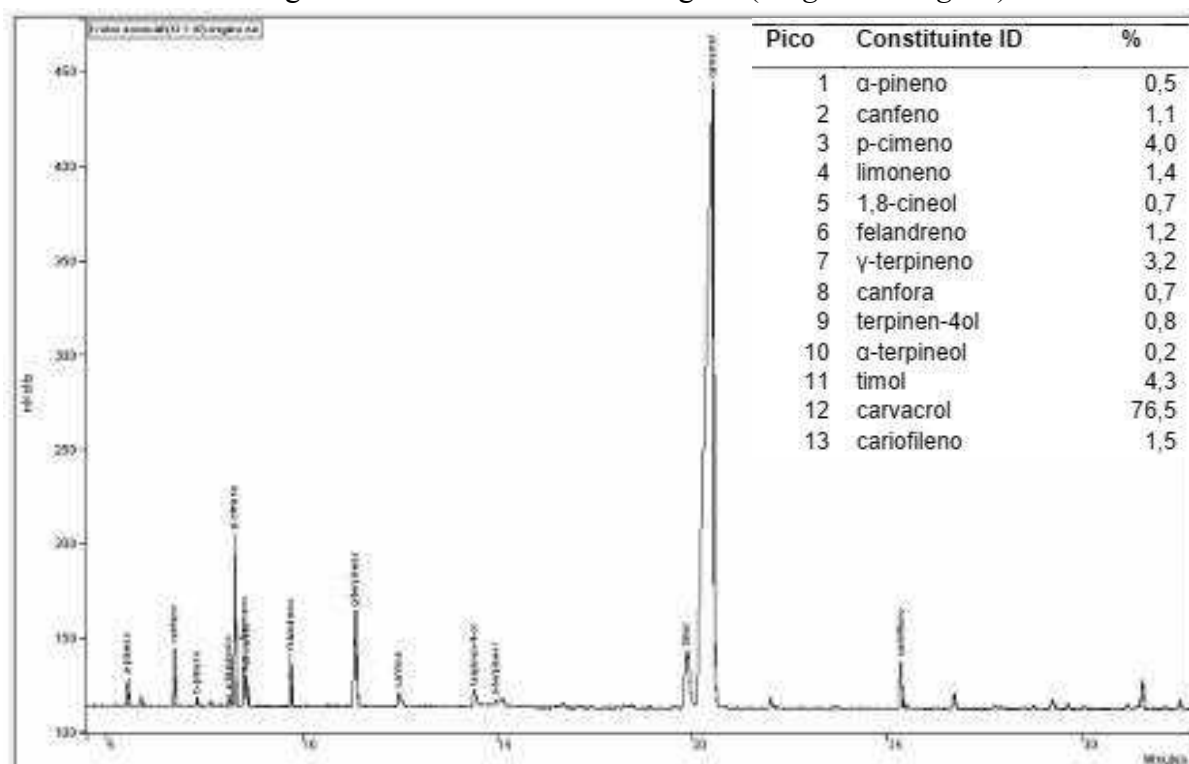
Compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução. Método de extração: destilação por arraste a vapor.

ANEXO E – Cromatograma do óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*)



Compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução. Método de extração: destilação por arraste a vapor.

ANEXO F – Cromatograma do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)



Compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução. Método de extração: destilação por arraste a vapor.