

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

JEAN MICHEL DE ALMEIDA MARCIOLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
PRODUTOS NATURAIS E ASSOCIAÇÃO COM CONSERVANTES QUÍMICOS DE  
ALIMENTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO

2015

JEAN MICHEL DE ALMEIDA MARCIOLI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
PRODUTOS NATURAIS E ASSOCIAÇÃO COM CONSERVANTES QUÍMICOS DE  
ALIMENTOS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de conclusão de curso II, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Tatiana Shioji Tiuman

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Solange Maria Cottica

TOLEDO

2015

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

JEAN MICHEL DE ALMEIDA MARCIOLI

## **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de produtos naturais e associação com conservantes químicos de alimentos**

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

---

Profª Dra. Solange Maria Cottica  
(Coorientadora - UTFPR)

---

Profº Dr Ricardo Fiori Zara  
(Banca – UTFPR)

---

Profª Dra Alessandra Cristine Novak Sydney  
(Banca –UTFPR)

Toledo, novembro de 2015

---

<sup>1</sup>A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso", conforme Instrução Normativa Conjunta 01/11 da PROGRAD/PROPPG.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

MARCIOLI, Jean Michel de Almeida. **Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana de produtos naturais e associação com conservantes químicos de alimentos**. 2015. 74 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo. 2015.

A oxidação lipídica e a contaminação por microrganismos são os principais fatores que causam grandes prejuízos nas indústrias alimentícias, levando à redução da vida útil dos produtos, alterações sensoriais e destruição de componentes essenciais, ocasionando assim um decréscimo do valor nutricional e segurança dos mesmos. Em contrapartida, as indústrias utilizam-se de aditivos químicos que tendem a impedir ou retardar tais efeitos. Porém, existe uma grande exigência por parte dos consumidores, os quais tendem a evitar produtos que possuam em sua composição aditivos de origem sintética, conscientes dos possíveis efeitos, o qual podemos destacar a formação de compostos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Neste contexto, as indústrias buscam por meios alternativos, que possam apresentar resultados iguais ou superiores aos aditivos sintéticos e que não apresentem efeitos nocivos à saúde. Nesse cenário, destacam-se o uso de aditivos naturais, visto que os mesmos oferecem maiores vantagens sobre seus homólogos artificiais, devido à sua natureza não tóxica juntamente com uma vasta gama de benefícios à saúde. Por isto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos brutos obtidos das cascas de romã, folha de pitanga e de óleos essenciais comerciais de capim-limão, erva-doce, hortelã d'água e hortelã do campo e pimenta malagueta e verificar sua atividade antimicrobiana quando associado aos conservantes químicos benzoato de sódio e metabissulfito de sódio. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, extratos brutos e dos conservantes químicos foi determinada através do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando-se a técnica de diluição em placa com 96 orifícios, frente as cepas das bactérias *Salmonella typhi* (ATCC 06539), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Para o teste de associação utilizou-se a técnica de “checkerboard”. Para a avaliação das atividades antioxidantes utilizou-se o método do DPPH. Os melhores resultados encontrados para a CIM foram para o extrato da casca de Romã com concentração igual a 0,625mg/mL frente as bactérias *B. cereus* e *S. aureus* e do extrato de casca de Romã frente a *Salmonella typhi* e o do extrato das folhas de pitanga frente a *Staphylococcus aureus*, ambos com resultado igual a 1,25 mg/mL. Quando associados com os conservantes químicos houve sinergismo nas associações contendo extrato da casca de romã com benzoato de sódio frente à *Salmonella typhi* e com o metabissulfito de sódio frente à *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*. Para a atividade antioxidante os resultados apresentados mostraram que os extratos da casca de romã e das folhas de Pitanga possuem maior atividade antioxidante quando comparada com os óleos em estudo com Concentração Inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) igual a 0,18 e 0,34 mg/mL, respectivamente. Com isso, verificou-se que muitas das plantas em estudo possuem bons resultados, podendo ser uma alternativa favorável para aplicação em alimentos como substituinte dos aditivos sintéticos.

**Palavras chaves:** óleos essenciais, concentração inibitória mínima, “checkerboard”, DPPH.

## ABSTRACT

MARCIOLI, Jean Michel de Almeida. **Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of natural products in combination with chemical food preservatives.** 2015. 74 L. Course Conclusion Paper (B. Tech Course in Chemical Processes). Federal Technological University of Paraná - UTFPR. Toledo. 2015.

The lipid oxidation and contamination by microorganisms are the main factors that cause great losses in food industries, leading to reduced useful life of products, sensory alterations and destruction of essential components, thereby causing a decrease in the nutritional value and safety. To fight this, industries use chemical additives that tend to prevent or retard such effects. However, there is a great demand from consumers who tend to avoid products containing in its composition synthetic origin additives, aware of the possible effects such as the formation of carcinogenic, mutagenic and teratogenic compounds. In this context, industries seek alternative means that may have results equal or superior to synthetic additives and show no adverse health effects. Hence, we highlight the use of natural additives, as they offer major advantages over their artificial counterparts due to their non-toxic nature along with a wide range of health benefits. Therefore, this study aims to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pomegranate peel, surinam cherry leaf and commercial essential oils of lemongrass, anise (erva doce), water mint, field mint and chilli pepper and verify their antimicrobial activity when associated with sodium benzoate and sodium metabisulphite chemical preservatives. The antimicrobial activity of the essential oils, extracts and chemical preservatives has been determined by the Minimum Inhibitory Concentration Test (CIM) with the dilution plate technique with 96 holes to the strains of the *Salmonella typhi* (ATCC 06539), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) and *Bacillus cereus* (ATCC 11778) bacteria. And the technique of "checkerboard" has been used for the association test. For the evaluation of antioxidant activity the DPPH method has been used. The best results found by the CIM were the pomegranate peel extract with concentration of 0.625 mg/mL to the *B. cereus* and *S. aureus* bacteria; the pomegranate peel extract to *Salmonella typhi*; and the surinam cherry leaves extract to the *Staphylococcus aureus* bacteria. Both with results equal to 1.25 mg/ml. When combined with chemical preservatives, there was synergistic combinations containing pomegranate peel extract with sodium benzoate to *Salmonella typhi*; and with sodium metabisulphite to *Salmonella typhi* and *Staphylococcus aureus* bacteria. For the antioxidant activity, the results showed that pomegranate peel extracts and sirinam leaves possess higher antioxidant activity when compared to the oils under study with 50% Inhibitory Concentration (IC<sub>50</sub>) equal to 0.18 and 0.34 mg/ml, respectively. Thus, it has been concluded that many of the test plants have good results as a favorable alternative for application in foods as a substitute for synthetic additives.

**Key words:** essential oils, minimum inhibitory concentration, "checkerboard", DPPH.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química de antioxidantes sintéticos.....	11
<b>Figura 2:</b> Exemplos de radicais livres. ....	20
<b>Figura 3:</b> Pitangueira .....	24
<b>Figura 4:</b> Fruto da <i>Punica granatum</i> (romã). ....	26
<b>Figura 5:</b> Capim limão ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) .....	28
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do anetol .....	29
<b>Figura 7:</b> Estrutura química (A) mentol, (B) mentona. ....	30
<b>Figura 8:</b> Pimenta malagueta ( <i>Capsicum annuum</i> ). ....	31
<b>Figura 9:</b> Simbolização da placa de microdiluição utilizado no teste de associação, representando as concentrações de extratos e conservantes em cada poço. ....	37
<b>Figura 10:</b> Reação do DPPH com um agente antioxidante. ....	38
<b>Figura 11:</b> Estrutura química (A) geraniol e (B) nerol. ....	43
<b>Figura 12:</b> Isobogramas das associações dos conservantes com o extrato das folhas de pitanga. ....	48
<b>Figura 13:</b> Isobogramas das associações dos conservantes com o extrato das cascas de romã. ....	49
<b>Figura 14:</b> Gráficos da atividade antioxidante dos óleos essenciais de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos das folhas de pitanga e cascas de romã. ....	51
<b>Figura 15:</b> Estrutura química típica de capsaicinóides, onde R representa cadeias carbônicas alifáticas que podem ser substituídas.....	53
<b>Figura 16:</b> Constituintes do óleo essencial de hortelã d'água. (A) $\alpha$ -pineno, (B) $\beta$ -pineno. ....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Concentrações utilizados dos óleos essências de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos de casca de romã e folhas de pitanga. ....	39
<b>Tabela 2</b> - Concentração inibitória mínima (mg/ml) dos óleos essenciais de erva doce, capim limão, hortelã d'água, hortelã do campo e pimenta malagueta e dos extratos de folhas de pitanga e casca de romã. ....	41
<b>Tabela 3</b> - Concentração inibitória mínima (mg/ml) dos conservantes químicos.....	44
<b>Tabela 4</b> - Concentração bactericida mínima (mg/ml) dos óleos essenciais de capim limão, hortelã do campo e pimenta malagueta e dos extratos de folhas de pitanga e casca de romã. .	45
<b>Tabela 5</b> - resultados do teste de associação dos extratos da casca de romã e folhas de pitanga com os conservantes Metabissulfito de sódio e benzoato de sódio.....	47
<b>Tabela 6</b> - porcentagem de inibição dos óleos essências de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos das folhas de pitanga e casca de romã em cada concentração estudada.....	50
<b>Tabela 7</b> - concentração do antioxidante que reduz metade dos radicais de DPPH (IC <sub>50</sub> ). ....	52



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 OBJETIVOS .....	13
1.1.1 Objetivo Geral .....	13
1.1.2 Objetivos específicos .....	13
1.2 JUSTIFICATIVA .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 MICRORGANISMOS .....	15
2.1.1 <i>Salmonella typhi</i> .....	15
2.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.1.4 <i>Bacillus cereus</i> .....	17
2.2 CONSERVANTES QUÍMICOS .....	17
2.2.1 Metabissulfito de sódio .....	18
2.2.2 Benzoato de sódio .....	18
2.3 ANTIOXIDANTES .....	19
2.3.1 Radicais Livres .....	20
2.4 PRODUTOS NATURAIS .....	21
2.5 ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS .....	22
2.6 EXTRATOS .....	23
2.6.1 Folhas da pitangueira .....	24
2.6.2 Romã .....	25
2.7 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	27
2.7.1 Capim limão .....	27
2.7.2 Erva doce .....	29
2.7.3 Hortelã d'água e hortelã do campo .....	30
2.7.4 Pimenta malagueta .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 MICRORGANISMOS .....	32
3.2 MATERIAL BOTÂNICO .....	32
3.2.1 Obtenção dos extratos brutos .....	33
3.3 TESTES MICROBIOLÓGICOS .....	33

3.3.1 Ativação das cepas.....	33
3.3.2 Teste de concentração inibitória mínima (CIM).....	34
3.3.3 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima.....	35
3.3.4 Testes de associação dos extratos com conservantes químicos.....	35
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
3.4.1 Determinação da Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>41</b>
4.1 TESTES MICROBIOLÓGICOS.....	41
4.1.1 Teste de concentração inibitória mínima (CIM).....	41
4.1.2 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	44
4.1.3 Testes de associação dos extratos com conservantes químicos.....	45
4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	50
4.2.1 Determinação da Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	50
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO I: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA DOCE.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO II: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ DO CAMPO ..</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO III: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO IV: COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA MALAGUETA.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO V: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ D'ÁGUA .....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE I: PLACAS TESTES DE ASSOCIAÇÃO .....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um aumento na exigência por produtos alimentícios seguros e livres de microrganismos patogênicos, uma vez que a contaminação de alimentos pode estar relacionada com o aumento de muitas doenças (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

No mundo todo, diariamente ocorrem inúmeros casos de intoxicação alimentar causados pela ingestão de produtos contaminados por microrganismos ou por toxinas liberadas por eles. Alguns autores como Kendall (2014) e Sudheesh et al. (2013) destacam os microrganismos mais comuns encontrados em alimentos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Campylobacter* sp., *Shigella* sp., *Penicillium citrinum*, dentre outros. Devido à vasta gama destes contaminantes de alimentos, torna-se indispensável o emprego de métodos de conservação e/ou adição de substâncias que impeçam a ação destes microrganismos.

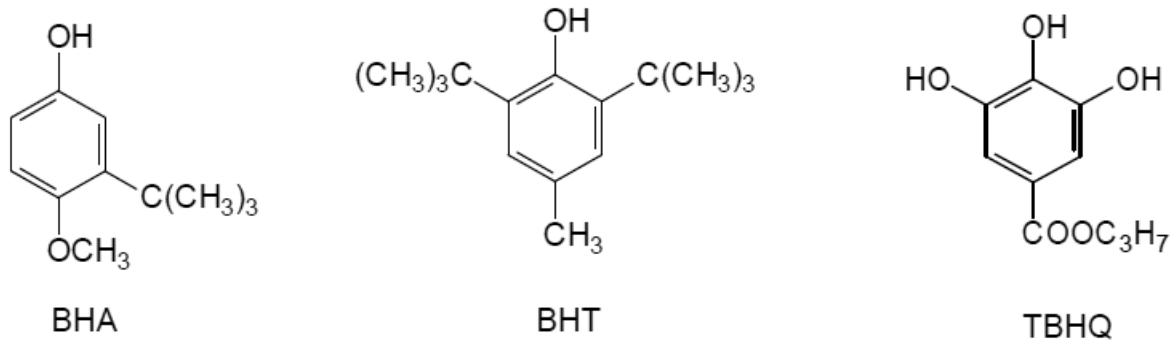
Outro fator que causa grandes prejuízos nas indústrias alimentícias são as oxidações lipídicas, que são responsáveis pela redução da vida útil dos produtos, alterações sensoriais tais como odores e sabores desagradáveis, além da destruição de componentes essenciais, ocasionando um decréscimo do valor nutricional e segurança (DEL RÉ; JORGE, 2012; MILANI, 2012).

Para que sejam evitados tais efeitos, é de extrema importância a adição de substâncias que evitem ou retardam a oxidação lipídica, aumentando assim a vida útil do produto. Porém, há um aumento das exigências por parte dos consumidores, que tendem a evitar produtos que possuam em sua composição aditivos de origem sintética, conscientes dos possíveis efeitos causados por estes (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011; MILANI, 2012).

Os aditivos químicos são substâncias que são adicionadas aos alimentos, sem o objetivo de aumentar sua qualidade nutricional, mas sim, de aumentar sua vida útil, e manter sua segurança, inibindo ou retardando as alterações provenientes de microrganismos ou enzimas (SILVA et al., 2009).

Segundo Abdumumeen; Risikat e Sururah (2012), os aditivos antimicrobianos mais comuns são o propionato de cálcio, nitrato e nitrito de sódio e potássio, sorbato de sódio, benzoato de sódio, entre outros. Já como aditivos antioxidantes Ramalho e Jorge (2006) citam os polifenóis, como 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-diterc-butil-p-creso (BHT),

terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (Figura 1), entre outros. Os benefícios e a segurança destes aditivos artificiais são objetos de debates entre pesquisadores e os órgãos reguladores em alimentos, toxicologia e biologia.



**Figura 1: Estrutura química de antioxidantes sintéticos.**

**Fonte: Prado (2009).**

Todos os aditivos artificiais são comprovadamente eficazes em sua função seja contra os microrganismos ou oxidação lipídica, mas vários deles apresentam efeitos colaterais negativos e considerados nocivos à saúde, já que podem apresentar potenciais mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. Seu emprego é limitado por legislações específicas apoiadas em critérios restritivos que levam em consideração as recomendações da Organização Mundial de Saúde (ANAND, SATI, 2013).

Neste contexto, há uma crescente busca por meios alternativos de conservação que preservem os atributos nutricionais e de qualidade dos alimentos. Com isto, existe uma grande tendência para a utilização de aditivos de origem natural como substituinte dos conservantes sintéticos.

Historicamente, as plantas têm sido usadas como um importante recurso ao alcance do ser humano. Elas significam um marco histórico na evolução de muitas nações, tem trazido melhorias nas condições de alimentação e cura para muitas enfermidades (ROZATTO, 2012). Alguns produtos, que são conhecidos como fitoquímicos, extraídos de diversas plantas, têm apresentado muitos resultados efetivos na preservação dos alimentos, possuindo propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo destacada a importância dos compostos fenólicos presentes nelas (MILANI, 2012).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, com cerca de mais de 20% do número total de espécies do planeta. Muitas destas plantas produzem metabólitos secundários, incluindo compostos em alta concentração com atividade antimicrobiana e antioxidante (SILVA, 2010).

Muitos destes aditivos naturais podem ser facilmente adquiridos e a sua utilização pode ser isolada ou em combinação com outras moléculas, podendo substituir total ou parcialmente o uso dos aditivos sintéticos. A escolha do aditivo deve-se basear na compatibilidade química e sensorial com o alimento alvo, na sua efetividade contra microrganismos indesejáveis, segurança, dentre outras características que torne mais favorável o seu uso do que o uso de aditivos sintéticos (SETTANNI; CORSETTI, 2008).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos brutos obtidos das cascas de romã, folha de pitanga e de óleos essenciais comerciais de pimenta malagueta, capim limão, hortelã d'água, hortelã do campo e erva doce.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos brutos das cascas de romã e folhas de pitanga por meio de maceração com solventes;
- Testar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e dos extratos por meio do teste de determinação da concentração inibitória mínima;
- Determinar a concentração inibitória mínima do benzoato de sódio e metabissulfito de sódio;
- Através dos resultados obtidos da concentração inibitória mínima dos extratos e óleos, avaliar a associação com o benzoato de sódio e metabissulfito de sódio;
- Avaliar a atividade antioxidantes dos extratos e óleos essenciais pelo método DPPH e determinar o  $IC_{50}$  dessas substâncias.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Atualmente existe uma grande preocupação em relação à vida útil e segurança dos alimentos. Desta forma, os fabricantes buscam utilizar aditivos, para assim obter produtos que atendam às exigências legais e garantir a segurança dos mesmos. Porém, existe também a preocupação relacionada aos possíveis efeitos nocivos dos aditivos sintéticos usados neste processo (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

As limitações ao uso de alguns aditivos químicos que apesar de serem efetivos contra bactérias trazem sérios efeitos adversos sobre a saúde, como a formação de compostos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Em relação a estes antimicrobianos, o uso indiscriminado destes nos alimentos privilegia a seleção de linhagens microbianas mais resistentes e portanto, de difícil controle (AUN et al., 2011; GUERREIRO; SÁ; RODRIGUES, 2012).

Os aditivos químicos são utilizados para aumentar o tempo de vida útil dos alimentos, pois combatem os microrganismos patogênicos e deteriorantes. De acordo com Rodrigues (2010), as crescentes ocorrências de doenças podem estar relacionadas com o uso indiscriminado de aditivos sintéticos nos alimentos.

Neste contexto, cada vez mais as indústrias buscam por meios alternativos, que possam apresentar resultados iguais ou superiores aos aditivos sintéticos, e que atendam as exigências dos consumidores que procuram por alimentos mais saudáveis. Nesse cenário, o uso de aditivos naturais é uma opção atraente, já que os mesmos oferecem maiores vantagens sobre seus homólogos artificiais, devido à sua natureza não tóxica juntamente com uma vasta gama de benefícios à saúde. Atualmente existem muitos estudos envolvendo a aplicabilidade de compostos obtidos de produtos naturais, que tendem a se desenvolver cada vez mais, devido a resultados positivos obtidos nas áreas de cosméticos, medicamentos e alimentos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos (MO) são uma forma de vida que não pode ser visualizada sem auxílio de um microscópio. Estes seres diminutos podem ser encontrados no ar, no solo, e, inclusive, no homem. Eles têm sido utilizados pelo homem em diferentes processos e de diferentes maneiras. Alguns deles, quando presentes em um alimento causam alterações benéficas e desejadas, modificando suas características originais, de forma a transformá-lo em um novo produto. Porém, muitos deles, podem causar as doenças transmitidas por alimentos (DTA's) e sérios problemas econômicos, decorrentes das perdas por produtos deteriorados. Estes são genericamente denominados de microrganismos patogênicos, podendo afetar tanto o homem, como animais. As características das doenças que causam dependem dos fatores inerentes ao alimento, do microrganismo patogênico envolvido e do indivíduo a ser afetado. Bactérias, fungos e leveduras são os microrganismos de maior destaque como agentes potenciais de deterioração e como eventuais patógenos ao homem (COSTA, 2014).

De acordo com Duarte (2012) os efeitos causados por microrganismos patogênicos em alimentos podem ser divididos em três mecanismos:

- Infecção: quando ocorre a ingestão dos microrganismos patogênicos e estes são capazes de penetrar e invadir tecidos.
- Toxinfecção: há ingestão do microrganismo patogênico e estes liberam toxinas prejudiciais ao ser humano. Isto ocorre no momento da multiplicação, esporulação ou lise no lúmen intestinal.
- Intoxicação: ocorre pela ingestão de toxinas liberadas pelos microrganismos no alimento, proveniente da sua proliferação ou esporulação.

#### 2.1.1 *Salmonella typhi*

*Salmonella enterica* sorovar *typhi* é uma bactéria bacilar gram negativa, aeróbia, não esporulada e não encapsulada, flagelada, patogênica oportunista e de rápido crescimento.



Geralmente as aves podem ser portadoras sadias da bactéria e constituir-se em veículo de difusão para outras espécies e humanos, provocando surtos endêmicos de toxi-infecções por consumo de produtos avícolas geralmente conservados ou elaborados de forma irregular. Os ovos são considerados a principal fonte de salmonelose humana, tendo como principal responsável a ingestão de ovos crus ou semicrus contaminados pela bactéria. É caracterizada por quadros de diarreia, febre e vômitos e que em casos extremos podem causar a doença septicemia e morte (SONCINI, 2014; TEIXEIRA et al., 2007).

### 2.1.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, mais conhecida pela abreviatura *E. coli*, se refere a gêneros diversos de bactéria bacilar Gram-negativa, anaeróbica facultativa e que não produzem esporos. A bactéria é um patógeno transmitido por alimentos. O contágio por *E. coli* se dá através da ingestão de água ou alimentos que não foram processados e tiveram algum tipo de contaminação fecal durante a sua produção, como por exemplo, leite não-pasteurizado manipulados de maneira não higiênica. De acordo com Alves (2012), existem basicamente quatro formas de *E. coli* que causam doenças gastrointestinais: enteropatogênica, enterotoxigênica, entero-hemorrágica e enteroinvasiva, levando a sintomas muitos semelhantes como diarreia, dores abdominais e dores de cabeça (FRANCO, 2002).

### 2.1.3 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, aeróbia ou anaeróbia facultativa, gram positiva que cresce na forma de cachos de uva, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção até infecções graves, é uma das principais causas de gastroenterite resultante do consumo de alimentos contaminados. A gastroenterite é uma inflamação aguda que compromete os órgãos do sistema gastrointestinal. Os alimentos que são frequentemente responsáveis por intoxicação alimentar incluem produtos como carnes, ovos, saladas, produtos de panificação, recheios de sanduíches, leite e produtos lácteos. Uma dose de toxina

menor do que 0,1 mg em alimentos contaminados produzirá sintomas de intoxicação caracterizadas por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia. No entanto, a contaminação de *Staphylococcus aureus* pode ser evitada por tratamento térmico dos alimentos (TEIXEIRA et al., 2007; BRESOLIN, DALL' STELLA, SILVA, 2005).

#### 2.1.4 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é uma bactéria beta hemolítica gram-positiva, de forma cilíndrica, endêmica, que vive no solo. É comumente encontrado em vários alimentos processados e crus como leites e derivados, cereais, carnes, vegetais, entre outros, causando diarreia, náusea e vômito. Estas alterações são atribuídas à ação de uma potente toxina emética ou das enterotoxinas, também conhecida como toxina diarreica ocorrendo um quadro de diarreia intensa, tenesmos retais e cólicas abdominais (GOMES et al., 2004).

## 2.2 CONSERVANTES QUÍMICOS

A conservação de um alimento consiste em manter as suas características físicas, químicas, microbiológicas e organolépticas o mais estável possível, mesmo em condições nas quais isso não seria viável. Os métodos de conservação podem ser processos físicos, químicos ou biológicos. Quando o alimento não pode ser submetido a processos físicos ou químicos e/ou biológicos de conservação, é necessária a utilização de conservantes químicos. A correta conservação é de grande importância em países tropicais, onde a deterioração em alguns alimentos é aumentada devido às temperaturas e umidades próximas ao ponto ótimo para o desenvolvimento dos microrganismos (CARDOSO; RUBENSAM, 2011).

Araújo (1990) afirma que os conservantes químicos são aditivos que possuem a função de inibir ou retardar o crescimento de microrganismos em um determinado produto, conservando-o livre de deteriorações causadas por bactérias, fungos e leveduras. Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular e/ou membrana celular, sobre a atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações enzimáticas ou sínteses de enzimas na célula microbiana, que pode levar a destruição destes microrganismos (SARTORI, 2005).

### 2.2.1 Metabissulfito de sódio

O metabissulfito de sódio é considerado uma agente sulfitante. De acordo com Machado; Toledo; Vicente (2006), os agentes sulfitantes são classificados como aditivos alimentares, atuando na inibição da deterioração provocada por bactérias, fungos e leveduras em alimentos ácidos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem.

Acredita-se que no organismo humanos os agentes sulfitantes entrem em contato com o ácido clorídrico produzido no estômago e gerem dióxido de enxofre gasoso. Essa substância pode ser inalada e pode produzir broncoconstrição através da indução de reflexo colinérgico no contato direto com as membranas traqueobrônquicas. Outra hipótese levantada é que o dióxido de enxofre pode vir a desencadear o reflexo colinérgico agindo de maneira indireta nas fibras nervosas, o que levaria a reações adversas não relacionadas às vias aéreas tais como diarreia, dor abdominal e cefaleia (AUN et al., 2011). Também se pode dizer que o emprego desta classe de conservante pode levar a episódios de asma em indivíduos sensíveis a essas substâncias e pode levar a redução da biodisponibilidade de algumas vitaminas como a tiamina (B1), ácido fólico (B9), piridoxina, nicotinamida, reduzindo a qualidade nutricional dos alimentos tratados (FAVERO, RIBEIRO, AQUINO, 2011; AUN et al., 2011; GUERREIRO; SÁ; RODRIGUES, 2012).

### 2.2.2 Benzoato de sódio

O benzoato de sódio é um sal do ácido benzoico aplicado como conservante e agente antimicrobiano utilizado em refrigerantes, sucos, geleias, margarinas, bebidas, aditivo anti fermentação para vinhos, suco à base de cana de açúcar e cidra, na área cosmética e formulações dentais e em produtos embutidos (KAWASE; COELHO; LUCHESE, 2008).

Aun et al. (2011) relatam que poucos trabalhos foram publicados sobre os mecanismos de reações dos benzoato e que em algumas pesquisas relataram que ao estudar pacientes com asma pode-se verificar o aumento da liberação de histamina e prostaglandinas

da mucosa gástrica após a exposição ao benzoato de sódio. De acordo com Abdulmumeen; Risikat e Sururah (2012) os benzoato podem estar relacionados com alguns casos de reações alérgicas, como urticária e asma, bem como que se acredita que eles podem causar danos ao cérebro.

### 2.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. São utilizados em muitos processos indústrias podendo ser sintéticos ou naturais. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) e o 2,6-diterc-butil-p-creso (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e  $\beta$ -caroteno e os compostos fenólicos. (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Dentre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos, os quais são classificados de acordo com as suas estruturas químicas. Os flavonoides se classificam em diferentes grupos: flavonas, flavanóis, flavonóis, flavononas, antocianinas e isoflavanóides. Estes compostos estão geralmente ligados a açúcares, formando glicosídeos. Já aos ácidos fenólicos, possuem estrutura mais simples dentre os compostos fenólicos, compreendendo um anel aromático com grupos ligados à sua estrutura, dentre os quais o mais comum é a hidroxila. Além desses compostos, outros também de natureza fenólica são os estilbenos, lignanos e, de forma polimerizada, os taninos e as ligninas (COSTA, 2011).

Podemos definir antioxidante como sendo aquele que em baixas concentrações retarda ou previne a oxidação do substrato, ou seja, funcionam com bloqueadores dos processos óxidos-redutivos provocados pelos radicais livres. Os antioxidantes têm a função de capturar os radicais livres impedindo a sua reação levando a modificações de proteínas, peroxidação lipídica e danos ao DNA (JARDINI, 2010; TOSCAN, 2010).

### 2.3.1 Radicais Livres

O termo radical livre pode ser definido como um conjunto de moléculas orgânicas e inorgânicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, o qual o torna altamente reativo. A presença desses radicais no organismo humano torna crítica a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (COSTA, 2011).

Estes radicais são formados espontaneamente no organismo, como produto de reações fisiológicas tais como: na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Causas exógenas também levam à formação dos radicais livres tais como: radiações gama, poluentes, praguicidas entre outros (COSTA, 2011; JARDINI, 2010). A Figura 2 mostra alguns dos principais radicais livres.

Nome	Estrutura	Natureza
Átomo de hidrogênio	$H^{\bullet}$	Radical livre de estrutura mais simples
Triclorometil	$\bullet CCl_3$	Radical carbônico formado durante o metabolismo do $CCl_4$ no fígado
Superóxido	$O^{\bullet -}$	Radical do oxigênio
Hidroxila	$OH^{\bullet}$	Radical do oxigênio
Tióis	$RS^{\bullet}$	Nome genérico do grupo de radicais sulfurônicos
Peroxila, alcóxila	$RO_2^{\bullet}, RO^{\bullet}$	radicais oxigênicos formados da quebra dos peróxidos orgânicos
Óxidos de nitrogênio	$NO^{\bullet}, NO_2^{\bullet}$	radicais do nitrogênio

**Figura 2:** Exemplos de radicais livres.

**Fonte:** Jardim (2010).

## 2.4 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos remotos. A ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido um dos primeiros produtos naturais utilizados para a busca por alívio e cura de doenças. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS JR, BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Hoje em dia a utilização de ativos biológicos obtidos a partir de plantas são utilizados em produtos comercializados no mundo inteiro. Pesquisadores da área de produtos naturais demonstram-se impressionados pela enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas desses ativos encontrados na natureza (ROZATTO, 2012).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos. Estas substâncias, são específicas de determinadas famílias, gêneros, ou espécies de plantas, cujas funções até pouco tempo eram desconhecidas. Muitas destas substâncias têm natureza antimicrobiana e antioxidante de grande interesse comercial (SARTORI, 2005).

As descobertas destas plantas significam um marco histórico na evolução de muitas nações, pois trouxeram melhorias nas condições de alimentação e a cura para muitas enfermidades. O uso de vegetais *in natura* pelas populações vem se intensificando diminuindo assim os usos de produtos químicos que possam apresentar efeitos indesejáveis (ROZATTO, 2012).

Em alguns países a utilização de produtos naturais é mais comum do que os sintéticos. Os agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais presentes nas plantas, animais ou microrganismos estão cada vez mais ganhando adeptos no âmbito da conservação e preservação natural de produtos. Óleo essencial ou extratos de vários tipos de plantas podem ser usados para esses fins e nos dão a perspectiva de obtenção de produtos mais saudáveis e seguros (BARBOSA, 2010).

Segundo Machado; Borges; Bruno (2011) nas últimas décadas, diversos conservantes naturais têm sido investigados para aplicação prática. O objetivo é encontrar moléculas que não apresentem efeitos adversos significativos nas propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos, e que aumentem a sua vida útil e segurança. Além disso, o uso dessas moléculas permitiria que novos produtos com melhor qualidade e propriedades nutricionais fossem introduzidos no mercado. Em um futuro próximo, o aumento do uso de conservante naturais em bens de consumo devido ao apelo do “consumo verde” que estimula o uso e o desenvolvimento de produtos naturais terão sua utilização quase que total em setores de cosmética, medicamentos e alimentos, eliminando e/ou diminuindo o uso dos sintéticos.

## 2.5 ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Os estudos e descobertas dos produtos naturais com princípios ativos com atividade antimicrobiana intrínseca ou em combinação com agentes sintéticos podem representar uma nova forma de fazer frente aos microrganismos multirresistentes, os quais são microrganismos resistentes a diferentes classes de antimicrobianos (antibióticos) testados em exames microbiológicos. A pressão seletiva realizada pelo uso de antimicrobianos, algumas vezes de forma indevida, tem levado a expansão da resistência microbiana. Sem o contato destes microrganismos com os produtos sintéticos, diminui-se o risco de se selecionar novos ou melhores mecanismos de resistência (CASTRO, 2010).

O uso de agentes antimicrobianos combinados já é uma prática comum em centros clínicos. Estas combinações têm como intuito potencializar o efeito antimicrobiano, uma vez que vários estudos têm demonstrado efeitos sinérgicos, podendo assim ser aplicadas para o controle de microrganismos que apresentam resistência aos agentes na forma isolada. Como em alguns casos a combinação de drogas ainda não apresenta resultados satisfatórios, é de grande interesse obter conhecimentos do mecanismo que determina o sinergismo entre as drogas, de modo a prever quando uma associação terá a sua eficiência aumentada ou não (BARBOSA, 2011).

Jardini (2005) define o sinergismo como sendo uma ação combinada entre dois ou mais compostos distintos que, atuam em conjunto para proporcionar um resultado superior comparado com a sua ação isoladamente. Porém, nem sempre a associação entre duas ou mais

substâncias apresentam resultados superiores, ou seja, possui efeito sinérgico. De acordo com Endo (2007) podem ocorrer outras interações como:

- Aditividade: o resultado da combinação é igual à soma dos resultados separadamente das substâncias;
- Autonomia ou Indiferença: quando associadas, as substâncias não apresentam diferenças em seus resultados;
- Antagonismo: O resultado da associação é inferior quando comparado aos resultados das substâncias isoladas.

Na área de alimentos, as combinações de produtos naturais com conservantes sintéticos, quando apresentam resultados mais eficientes permitem com que sejam utilizadas menores doses de cada droga, ou seja, tem a vantagem de se utilizar uma menor concentração de aditivo químico (CASTRO, 2010). Nesse sentido, o desenvolvimento deste trabalho apontará possíveis associações entre aditivos sintéticos e naturais contribuindo, assim para que essas associações possam futuramente ser utilizadas no controle de microrganismos que podem se desenvolver em alimentos que passam por processamento antes de sua comercialização.

## 2.6 EXTRATOS

Os extratos são preparações concentradas de diversas consistências possíveis, obtidas a partir de vegetais secos, que passam ou não por tratamento prévio tais como: inativação enzimática e moagem. Eles são preparados por processos envolvendo solvente e necessitam de duas etapas para a obtenção do extrato. A primeira envolve a separação dos compostos específicos de um meio complexo (a droga, ou parte da planta utilizada) utilizando solvente e gerando o extrato, e a segunda envolve a concentração deste extrato, que elimina total ou parcialmente o solvente. O uso destes extratos vegetais e fitoquímicos com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 65 - 80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (GONÇALVES, FILHO, MENEZES, 2005).



### 2.6.1 Folhas da pitangueira

A pitangueira ou pitanga, pertence à espécie *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Esta família possui espécies com uso como antioxidante, hipoglicemiante, anti-hipertensivo. Conhecida e é caracterizada também pela presença de taninos, flavonoides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e derivados do floroglucinol (BAGETTI, 2009).

Ela cresce em regiões de clima tropical e subtropical, sendo nativa da mata atlântica brasileira onde é valorizada por sua folha rica em propriedades benéficas a saúde e seu fruto é utilizado na alimentação devido ao seu aroma e sabor peculiares (VIANA, SANTANA, MOURA, 2012). A pitangueira é uma árvore pequena (Figura 3) caracterizada por possuir folhas de cor vinho quando novas e, quando adultas, folhas opostas, verde-escuras, brilhantes, ovais e inteiras.



**Figura 3: Pitangueira**

**Fonte: autoria própria.**

Viana, Santana e Moura (2012) analisaram o extrato das folhas de *Eugenia uniflora* L. e observaram a presença de flavonoides e taninos hidrolisáveis. Os flavonoides têm uma

ampla ação biológica podendo ser pelo simples fato alimentício, mas também pode ter ação medicinal. Os benefícios causados pela ingestão de frutas e outros vegetais se deve a estes compostos, eles auxiliam na absorção de vitamina C, podem ter ação anti-inflamatória, antialérgica, anti-hemorrágica, mas atribuímos sua ação mais importante a de antioxidante. Diversos estudos sobre atividade dos taninos evidenciaram importante ação antibacteriana, ação sobre protozoários, na reparação de tecidos, regulação enzimática e proteica, entre outros. Estes efeitos dependem da dose, tipo de tanino ingerido e período de ingestão (BAGETTI, 2009; CASTEJON, 2011)

Brun e Mossi (2010) realizaram estudos para a caracterização dos componentes químicos e a atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga. Na análise cromatográfica da composição química para o óleo essencial das cascas secas obtiveram-se como compostos majoritários o curzereno a selina- 1,3,7(11)-trien-8-ona, atracitolona, furanodiona e germacrona e em relação ao teste antimicrobiano o mesmo apresentou resultado positivo para Gram-positivas: *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus epidermidis* e Gram negativa: *Xanthomonas campestris*.

Oliveira et al. (2008) realizaram extrações do fruto e da folha da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e avaliou extrato hidroalcoólico do fruto maduro, extrato hidroalcoólico do fruto verde, infuso da folha fresca e óleo essencial da folha fresca e observou a presença de halos de inibição para os extratos hidroalcoólicos produzidos a partir do fruto verde e maduro, bem como do infuso da folha fresca da pitanga. O óleo essencial da folha da pitanga não mostrou atividade antibacteriana para as bactérias estudadas.

### 2.6.2 Romã

A árvore da romã, ou romãzeira (*Punica granatum*), pertence a família das punicáceas e dá o fruto chamado romã (Figura 4). Nativa do Irã, e foi levada pelos fenícios para a região do mar Mediterrâneo, de onde se difundiu para as Américas, chegando ao Brasil por meio dos portugueses (PINTO; CORRÊA, 2014). Seu fruto é considerado símbolo da vida, conhecimento, imortalidade e até da divindade, possui aspecto globóide ou esférico e em seu interior possui sementes ou bagos de cor rósea (BARBOSA, 2010).



**Figura 4: Fruto da *Punica granatum* (romã).**

**Fonte: Pinto; Corrêa (2014).**

De acordo com Pinto e Corrêa (2014) suas folhas e casca são usadas na medicina contra irritação nos olhos, infecção de garganta, diarreias e desintérias crônicas. Suas cascas são ricas em taninos elágicos, sendo este dotado de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringes* e contra o vírus Herpes simplex II, responsável pelo herpes genital. Além disso, suas cascas contêm cerca de 0,6 a 0,7 % de alcaloides tais como a peletierina e a pseudo-peletierina, responsáveis pelas propriedades tenífugas da romã.

A romã é conhecida por ser umas das frutas mais saudáveis, por sua alta atividade antioxidante, sendo que a casca apresenta uma elevada atividade devido à grande quantidade de compostos fenólicos presente nela (GIL et al., 2000; SINGH; MURTHY; JAYAPRAKASHA, 2002; AVIRAM et al., 2004; AVIRAM et al., 2008; ANIBAL, 2010).

Gomes et al. (2014) avaliaram os taninos obtidos da casca da planta *Punica granatum* verificando atividade eficaz contra *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 78 µg/mL. conclui-se que o extrato das cascas utilizadas possui alta atividade antimicrobiana.

Resultado semelhante é mostrado no trabalho de Trindade, Fonseca e Juiz (2009) em que o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* apresentaram sensibilidade a tintura hidroalcoólica da casca da romã. Esses resultados indicam que a romã se mostra efetiva na inibição do crescimento de bactérias Gram positivas, especificamente de *Staphylococcus aureus*.

## 2.7 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são importantes matérias-primas industriais utilizadas na manufatura de produtos dos setores da perfumaria, cosmética, farmacêutica, higiene e limpeza, alimentícia e bebidas. Eles podem ser extraídos de diversas espécies vegetais, a partir das suas folhas, frutos, caule, raízes, e levam características da planta o qual se extraiu tal como o odor e o sabor (BELTRAME et al., 2010).

O termo “óleo essencial” foi definido no século XVI por Paracelso, médico e alquimista suíço. Ele pode ser caracterizado quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, responsáveis por gerar sabores e/ou aromas. Fisicamente, são encontrados no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO<sub>2</sub> supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras (PROBST, 2012).

Atualmente vários estudos vêm sendo desenvolvidos acerca de diferentes óleos essenciais. O Brasil é um dos destaques na produção desses óleos, juntamente com a Índia, China e Indonésia, devido a vasta diversidade de plantas que podem ser encontradas nestes países (MIRANDA, 2010).

### 2.7.1 Capim limão

O capim limão (*Cymbopogon citratus*) (Figura 5) é uma espécie vegetal originária da Índia e amplamente distribuída, em especial em zonas tropicais. No Brasil, assume diferentes denominações populares: capim-limão, capim-santo, erva-cidreira, capim-catinga, capim-de-cheiro, capim-cidrão, capim-cidilho, capim-cidro e capim-ciri. Pertence à família Poaceae, também denominada Gramineae (ROCHA, 2011).



**Figura 5: Capim Limão (*Cymbopogon citratus*)**

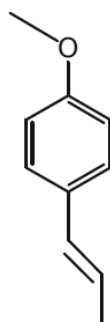
**Fonte: Machado et al. (2012).**

A atividade antimicrobiana do capim limão é citada em vários estudos e sugere-se que o citral é o principal responsável por esta atividade. Schuck et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos comprovaram a acentuada atividade antifúngica sobre *Candida albicans*, superando os valores de inibição do antifúngico padrão (nistatina). Já Falcão; Pereira e Milão (2009) testaram o óleo essencial de capim-limão frente aos microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cândida albicans* e *Aspergillus niger* pelo método bioautográfico, no qual obtiveram resultados positivos em relação a *E. coli*.

Machado et al. (2012) conclui que o óleo essencial de capim limão tem atividade antimicrobiana contra os agentes patogênicos de origem alimentar e bactérias associadas à deterioração de alimentos, sendo que em seu estudo a bactéria *Staphylococcus aureus* foi a que apresentou maior sensibilidade ao mesmo, apresentando halo de inibição de  $33 \pm 2,8$  mm/mL, concluindo assim que o óleo essencial tem potencial antimicrobiano frente a esse microrganismo.

### 2.7.2 Erva doce

A erva-doce (*Pimpinella anisum*) é uma planta da família das Apiaceae, anteriormente chamadas Umbelliferae. O constituinte primário do óleo (cerca de 90%) é o anetol (Figura 6).



**Figura 6: Estrutura química do anetol**

**Fonte: Moraes et al., (2006).**

É possível atribuir ao anetol o efeito antioxidante e anti-inflamatório de algumas plantas como é relatada por alguns autores (FREIRE et al. 2005; ABRAHAM, 2001; CHAINY et al., 2000; DUVOIX et al., 2004).

Pereira et al (2009) ao avaliar a ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de Goiaba, Jamelão e erva doce sobre cepas padrão de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Bacillus atropheus* (esporos), observou que dentre os extratos utilizados, o extrato glicólico de erva doce foi o mais efetivo frente aos microorganismos testados.

A atividade antioxidante e notável ação antibacteriana para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas também foi demonstrado por Gulçin; Oktay e Kufrevioglu (2003).

### 2.7.3 Hortelã d'água e hortelã do campo

A Hortelã d'água (*Mentha aquatica*) e o hortelã do campo (*Mentha arvensis*) são consideradas ervas perenes e pertencem ao gênero *Mentha* L. da família *Lamiaceae*, cujas espécies são vulgarmente chamadas mentas ou hortelãs.

Os óleos essenciais de diferentes espécies de *Mentha* ssp. apresentam atividade antimicrobiana frente a diversas bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*, e alguns autores sugerem que o mentol e mentona (Figura 7) sejam os responsáveis por esses resultados (SIVROPOULOU et al., 1995; SARTORATTO et al., 2004; DUARTE et al., 2005; YADEGARINIA et al., 2006; MAHADY; PENDLAND; STOIA, 2005; FURAHATA et al., 2000; ISCAN et al., 2002). Já Araújo et al (2010) ao estudarem a *Mentha* spp. obtiveram bons resultados na atividade antioxidante, comprovando o potencial que a família *Lamiaceae* pode possuir neste aspecto.

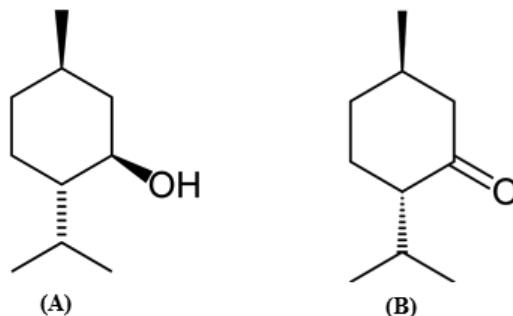


Figura 7: Estrutura química (A) mentol, (B) mentona.

Fonte: adaptado de Almeida (2006).

### 2.7.4 Pimenta malagueta

A pimenta malagueta (*Capsicum annuum*) e pertencem à família *Solanaceae* (Figura 8). A pimenta é um condimento popular em todo o mundo conhecido por conter capsaicina e dihidrocapsaicina como os maiores ingredientes pungentes (OLIVEIRA, 2011).



**Figura 8: Pimenta malagueta (*Capsicum annuum*).**

**Fonte: Souza (2012).**

Costa et al. (2009) verificou que o extrato bruto de pimenta malagueta apresenta grande concentração de fenólicos totais, sendo assim, ao avaliar a atividade antioxidante através do método DPPH, obteve-se resultados positivos em todas as concentrações testadas, com desempenho a superior a BHT.

De acordo com Oliveira (2011) as pimentas contêm muitas substâncias fisiológicas ativas como ácido ascórbico, tocoferol, carotenóides, entre outros, que são importantes na proteção contra danos oxidativos produzidos pelos radicais livres além de apresentarem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, tais como na inibição do crescimento do patógeno gástrico *Helicobacter pylori*.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMOS

O trabalho experimental foi desenvolvido nos Laboratórios de Físico-Química, Análise Instrumental e Microbiologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo.

Utilizou-se cepas das bactérias *Salmonella typhi* (ATCC 06539), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), para os testes microbiológicos. As mesmas foram armazenadas em geladeira (Bosch, style: single door 34) no laboratório de microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo.

#### 3.2 MATERIAL BOTÂNICO

Os produtos testados foram adquiridos da empresa Chá&Cia da cidade de Jacareí, São Paulo, já desidratadas acompanhadas de seus laudos, devidamente identificadas botanicamente como *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) (ref: 3516, LT:090109) onde se utilizou as folhas e *Punica granatum* (romã) (ref: 3705, LT:010812) onde se utilizou as cascas.

Para a obtenção dos extratos as folhas e cascas foram moídas com auxílio de um moinho de facas (Willye, modelo SL-30, Solab) obteve-se pós-finos e armazenou-se os mesmo em embalagens a vácuo, protegidas da umidade e calor.

Os óleos essenciais foram adquiridos da empresa Laszlo da cidade de Belo Horizonte – MG, acompanhadas de seus respectivos laudos, indicando os componentes presentes e suas proporções. Os óleos estudados foram: pimenta malagueta (*Capsicum annum*) LT:1895, erva doce (*Pimpinella anisum* L) LT: 1854, capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) LT: 1276, hortelã do campo (*Mentha arvensis*) LT:1960 e hortelã d'água (*Mentha aquatica*) LT: 1896. Todos foram armazenados em suas respectivas embalagens, protegidos do sol e umidade.

### 3.2.1 Obtenção dos extratos brutos

Para a obtenção do extrato utilizou-se a metodologia adaptada de Soares et al. (2008), por maceração em solvente. O solvente utilizado para a obtenção dos extratos foi uma solução hidroalcoólica com aproximadamente 90% de etanol, concentração esta obtida através da diluição de etanol PA da marca Alphatec.

Pesou-se em frascos âmbar cerca de 100 g de pó das folhas de pitanga e 100 g para o pó da casca de romã. Adicionou-se a solução hidroalcoólica em uma proporção de 1:5 (g/mL). Os pós permaneceram em contato com a solução hidroalcoólica por um período de sete dias, sendo agitadas três vezes ao dia. Posteriormente o extrato fluido foi filtrado com auxílio de uma bomba a vácuo sendo que a torta foi armazenada ao frasco âmbar novamente e o filtrado concentrado em rotaevaporador (Marconi, modelo MA 120), em temperatura de 45°C com rotação de 15 rpm. Colocou-se o concentrado em potes de vidro e acondicionado em freezer.

Colocou-se o solvente recuperado junto com a torta em frasco âmbar para uma nova extração, onde permaneceu por um período de cinco dias. Em seguida procederam-se as mesmas etapas citadas anteriormente. O concentrado obtido foi homogeneizado com o anterior e levado à estufa a 35°C para a evaporação total da água e obtenção dos extratos brutos da folha da pitanga e da casca da romã.

## 3.3 TESTES MICROBIOLÓGICOS

### 3.3.1 Ativação das cepas

As cepas foram ativadas em caldo Muller Hilton, e após um período de 24 horas a 35° em estufa (Tecnal), as mesmas foram colocadas em placas de Petri contendo ágar Muller Hilton. A semeadura das bactérias foi realizada em forma de estrias. As placas foram mantidas em estufa a 35°C por um período de 24 horas, em seguidas armazenadas em geladeira para a preservação das bactérias. Quinzenalmente eram realizados repiques.

### 3.3.2 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

O teste foi realizado de acordo com a metodologia CLSI (2008), utilizando-se a técnica de diluição em placa com 96 orifícios.

Em tubos de ensaio estéreis contendo cerca de 5mL de caldo Mueller Hilton foi pego com auxílio da alça de semeadura cerca de 5 a 6 colônias de bactérias da placa de Petri incubados em estufa por 24 horas a 35°C.

Para padronizar uma concentração de inóculo para o teste de sensibilidade, utilizou-se o controle de turbidez da escala Mc Farland de 0,5. Esta foi obtida através do preparo de uma solução salina de sulfato de bário ( $\text{BaSO}_4$ ). A obtenção da concentração correta do controle de turbidez foi determinada por absorvância em um espectrofotômetro de feixe duplo (PG Instruments modelo T80+) sendo que realizou-se a leitura no comprimento de onda de 625nm e o resultado permaneceu dentro dos parâmetros estabelecidos de 0,08 a 0,10 de absorvância. Para garantir a estabilidade da solução, armazenou-se a mesma em tubos de ensaio com tampas, envolto por papel alumínio em temperatura ambiente, protegido de umidade, luz e calor. Quinzenalmente realizou-se a leitura da solução para certificar que a mesma permanecia dentro dos parâmetros.

Para o preparo da bactéria para o teste, em um microtubos de centrifugação diluiu-se cada tipo de bactéria a ser testada em concentrações de 1:20, para isso misturou-se 50  $\mu\text{L}$  de inóculo padronizado com a escala Mc Farland, com 950  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hinton.

Em um microtubo de centrifugação preparou-se uma solução contendo 10 mg de cada extrato e óleo essencial pesados em balança analítica da marca Shimadzu, modelo AY220, devidamente calibrada. Ao microtubo adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo), onde após a diluição completa dos extratos e óleos essenciais adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller Hilton.

Realizou-se a diluição na vertical, sendo que na última linha adicionou-se o padrão negativo (meio + bactéria), que serviu de referência do crescimento bacteriano.

Utilizando-se de um micropipetador multicanal, pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura em cada poço e 100  $\mu\text{L}$  de extrato anteriormente preparado e colocado na primeira linha de poços. Em seguida, realizou-se uma diluição seriada até o penúltimo poço da placa, onde nesta o coletado foi descartado.

Pipetou-se 10  $\mu\text{L}$  do inoculo preparado anteriormente com o auxílio do micro pipetador, ao final agitou-se a placa levemente e colocou-se em um frasco fechado, com algodão molhado ao lado para manutenção da umidade e então se levou a estufa por 24 horas à 35°C. Após esse tempo, realizou-se a leitura visual para obter a mínima concentração capaz de inibir o crescimento da bactéria em teste.

O mesmo teste foi utilizado para avaliar a CIM dos conservantes químicos, metabissulfito de sódio e benzoato de sódio, no qual, a quantidade utilizada foi de 30 mg/mL e não foi necessário a utilização de solventes, sendo a dissolução realizada somente em caldo Mueller Hilton.

### 3.3.3 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima

O teste foi realizado utilizando-se dos resultados obtidos da CIM, onde se procurou saber se a concentração apenas inibia o crescimento ou era capaz de matar a bactéria, para isso adicionou-se em placas de Petri estéril ágar Mueller Hilton. Dividiu-se em seis partes, e cada parte semeou-se o material que deram resultados positivos para a Concentração Inibitória Mínima em forma de estrias, nos casos em que mais de uma concentração apresentou resultado positivos utilizou-se a menor concentração e as duas concentrações anteriores.

As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Após o período o material foi analisado. Considerou-se que se no período de 24 horas não houve o crescimento bacteriano a concentração foi considerado bactericida, caso contrário apenas inibidor de crescimento (bacteriostático).

### 3.3.4 Testes de associação dos extratos com conservantes químicos

Realizou-se os testes de associação adaptada da técnica de “*checkerboard*” descrito por Endo (2007) utilizando-se placas de micro diluições com 96 poços, preparadas em caldo Mueller Hilton. Realizou-se o teste apenas os que apresentaram resultados igual ou inferior a 1,25 mg/mL no teste de CIM, sendo assim apenas realizou-se com os extratos de casca de

romã e das folhas de pitanga. Para o teste de associação utilizou-se os conservantes: Benzoato de sódio e Metabissulfito de sódio.

O método “*checkerboard*” é uma técnica usada para medir “in vitro” a atividade antimicrobiana de combinações de agentes antimicrobianos. As vantagens do método são várias (a) fácil entendimento, (b) a interpretação e os cálculos matemáticos são simples, (c) pode ser utilizada em sistemas de microdiluição, e (d) é uma técnica frequentemente usada em estudos de sinergismo (MUKHERJEE et al., 2005).

Para a padronização das bactérias utilizou-se como padrão a escala McFarland de 0,5, e as concentrações dos conservantes foi de 15000 µg/mL a 234,3 µg/mL e para os extratos foi de 5000 µg/mL a 4,88µg/mL.

Em um microtubo de centrifugação preparou-se uma solução contendo 10 mg de cada extrato pesados em balança analítica da marca Shimadzu, modelo AY220, devidamente calibrada. Ao microtubo de centrifugação adicionou-se 100 µL de DMSO, onde após a diluição completa dos extratos adicionou-se 900 µL de caldo Mueller Hilton.

Para o teste adicionou-se inicialmente 100 µL de caldo Mueller Hinton em cada poço da placa, exceto no poço 12A onde neste adicionou-se 200µL da solução contendo o extrato. Nos poços 12B até 12H adicionou-se 100 µL da solução do extrato, em seguida realizou-se a diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2.

Da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionou-se 100 µL da solução do conservante e em seguida precedeu-se a diluição seriada até a linha G.

Sendo assim, a coluna 1 contém apenas o conservante e a linha H apenas extrato. No poço H1 foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja, apenas caldo e bactéria. A Figura 9, representa a concentração de extrato e de conservante contido em cada poço.

↓ Conservantes (µg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	15000	15000	15000	15000	150	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>B</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500
<b>C</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750
<b>D</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875
<b>E</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5
<b>F</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7
<b>G</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3
<b>H</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

↑ Extratos (µg/mL)

Figura 9: Simbolização da placa de microdiluição utilizado no teste de associação, representando as concentrações de extratos e conservantes em cada poço.

Fonte: autoria própria.

Em todos os poços adicionou-se 10 µL da suspensão bacteriana padronizada e diluída 1:20. Em seguida a placa foi incubada a 35°C por 24 horas e após o término foi analisado a concentração inibitória mínima dos extratos em associação com conservantes químicos através da leitura visual.

Para determinar se houve sinergismo utilizou-se a equação 1, onde se determina o Índice de Concentração Fracional Inibitória (FICI), que é determinado sinergismo quando o valor de  $FICI \leq 0,50$ , valores de 0,60 a 0,90 aditividade, valores igual a 1,00 indiferente e valores acima de 1,00 antagonismo.

$$FICI = \frac{CIM_A \text{ em combinação}}{CIM_A \text{ Isolado}} + \frac{CIM_B \text{ em combinação}}{CIM_B \text{ Isolado}} \quad (1)$$

Onde:  $CIM_A$  representa a concentração inibitória mínima dos extratos e  $CIM_B$  representa a concentração inibitória mínima dos conservantes.

Os resultados foram também interpretados através do isobolograma, onde elaborou-se um gráfico tendo no eixo X a concentração dos conservantes e no eixo Y a concentração

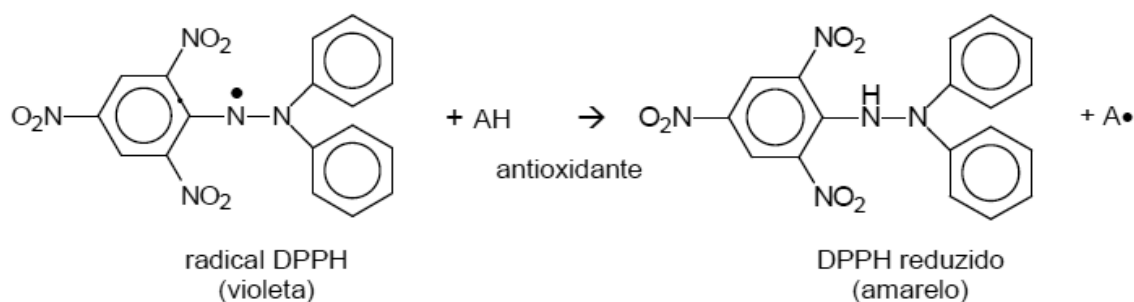
dos extratos, e conectou-se os pontos referente à combinação das duas substâncias onde ocorreu a inibição

### 3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.4.1 Determinação da Atividade antioxidante pelo método DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante utilizou-se os seguintes reagentes: DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Aldrich), Metanol P.A. (Alphatec) e Etanol P.A. (Alphatec).

Utilizou-se o método fotolorimétrico, adaptada de Rebelo et al. (2009) e Rufino et al. (2007) que é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical livre DPPH, que ao se reduzir perde sua coloração violeta, adquirindo coloração amarelada, através da reação mostrada na Figura 10.



**Figura 10: Reação do DPPH com um agente antioxidante.**

**Fonte: Prado (2009).**

Preparou-se uma solução inicial de 90  $\mu\text{M}$  de reagente de DPPH em metanol P.A. e após 1h protegido da luz e em temperatura ambiente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (T80+ PG Instruments) em 515nm, o valor da absorbância serviu de referência para determinar as concentrações a serem utilizadas nos testes.

Utilizou-se 4 concentrações diferentes para cada óleo essencial e extratos (Tabela 1). Os óleos essenciais e extratos foram pesados em balança analítica (Shimadzu, modelo AY220), e diluídos em etanol P.A.

**Tabela 1 - Concentrações utilizados dos óleos essenciais de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos de casca de romã e folhas de pitanga.**

<b>Plantas</b>	<b>Concentrações (mg/ml)</b>			
Hortelã d'água	100	150	200	250
Pimenta malagueta	5	10	30	40
Casca de romã	0,10	0,125	0,166	0,25
Folhas de pitanga	0,25	0,33	0,40	0,50

Em tubos mantidos em temperatura ambiente e ausência de luz adicionou-se 100  $\mu$ L da solução contendo o extrato/óleo essencial e 4 mL de solução de DPPH. Após 1 h em repouso realizou-se a leitura no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 515 nm, para a verificação da redução da absorbância do radical livre. O metanol P.A. foi utilizado como branco. O teste foi realizado em triplicada para todas as plantas e concentrações em estudo.

Através dos valores obtidos de absorbância calculou-se a média e o desvio padrão e através da equação 2 obteve-se a Porcentagem de Atividade Antioxidante (PAA), também conhecida como Porcentagem de inibição (PI).



$$PI = \frac{100 - [(A - B) \times 100]}{C} \quad (2)$$

Onde: A é média das absorvâncias das amostras, B é a média das absorvâncias do branco e C é a Absorvância da solução inicial de DPPH (90 µM).

Com os resultados utilizando-se o Windows/Excel, onde plotou-se as concentrações utilizadas no eixo X e as respectivas PI no eixo Y e então, obteve-se a equação da reta. Através desta calculou-se o IC<sub>50</sub> (concentração capaz de inibir 50% do radical DPPH).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 TESTES MICROBIOLÓGICOS

#### 4.1.1 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima, são mostrados na tabela 2.

**Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (mg/ml) dos óleos essenciais de erva doce, capim limão, hortelã d'água, hortelã do campo e pimenta malagueta e dos extratos de folhas de pitanga e casca de romã.**

	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Capim limão	2,50	5,00	5,00	2,50
Erva doce	SR	SR	SR	SR
Hortelã d'água	SR	SR	SR	SR
Hortelã do campo	SR	5,00	SR	SR
Pimenta malagueta	2,50	SR	SR	5,00
Folhas de pitanga	2,50	SR	SR	1,25
Casca de romã	0,63	1,25	2,50	0,63

Legenda: (SR) sem resultados, os mesmos não apresentaram resultados dentro das concentrações estudadas.

Avaliou-se a CIM em concentrações que variaram de 5,00 - 0,08 mg/mL, sendo que o resultado mais expressivo foi para o extrato bruto da casca de romã com concentração igual a 0,63mg/mL frente as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

Muitos autores apresentam resultados positivos utilizando extratos da casca de romã, sendo que resultados semelhantes podem ser vistos, principalmente sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* (ENDO, 2007; SILVA et al., 2013; PEIXOTO et al., 2014; MALVEZZI, 2010, NIMRI; MEQDAM; ALKOFABI, 1999). Silva et al. (2008) ao

estudarem a romã frente a 38 cepas diferentes de *Staphylococcus aureus*, puderam verificar que a mesma apresentou atividade bacteriostática.

Nimri; Meqdam; Alkofahi (1999) ao estudar a ação de extratos etanólicos de 15 plantas da medicina tradicional do oriente médio, puderam observar que a romã, foi uma das que apresentou melhores resultado em relação a atividade antibacteriana. Neste estudo o extrato da casca da romã inibiu todas as espécies bacterianas testadas, tanto Gram positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) quanto Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*) e os autores destacaram que os taninos foram os componentes encontrados em todas as plantas que apresentaram atividade antibacteriana.

Lansky e Newman (2007) destacaram que a efetividade da casca da romã como agente antimicrobiano deve-se aos seus principais constituintes, tais como: os alcaloides (peletierina, isopeletierina, metilpeletierina), taninos, compostos fenólicos (antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos) e flavonoides.

Neste estudo além do extrato da casca de romã frente as bactérias *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* também considerou-se bons os resultados obtidos pelo extrato de casca de romã frente a *Salmonella typhi* e o do extrato das folhas de Pitanga (*Eugenia uniflora*) frente a *Staphylococcus aureus*, ambas com resultado igual a 1,25 mg/mL.

Souza et al. (2004), também evidenciaram atividade de antimicrobiana da pitanga, onde o óleo essencial obteve resultados frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*.

Silva (2010) realizaram estudo com objetivo de comparar a ação inibidora de extratos e óleos essenciais de quatro plantas (pitanga - *Eugenia uniflora*, alecrim do campo - *Baccharis dracunculifolia*, camomila - *Matricaria chamomilla* e assa peixe - *Vernonia polyanthes*) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e verificou-se efeito antimicrobiano para todos os produtos vegetais, com uma discreta tendência de maior susceptibilidade para a bactéria gram positiva. O extrato de pitanga foi uma das mais efetivas sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e tal resultado pode-se atribuir a presença de flavonoides e taninos característicos nesta espécie vegetal, embora estudos futuros devam caracterizar individualmente tais tipos de flavonoides e taninos em particular.

Os óleos essenciais de hortelã d'água e erva doce não apresentaram nenhum resultado nas concentrações estudadas. O óleo essencial de erva doce mesmo apresentando 90,6% de anetol (Anexo I) não se mostrou efetivo, e pode-se dizer que a sua isomeria

espacial, que para esse óleo se encontra na forma *cis*-anetol, possa ter influenciado no resultado.

O óleo essencial de hortelã do campo utilizado no estudo apresenta em sua composição 10 compostos sendo que os majoritários são o mentol (55,5%) e mentona (16,7) e os demais com concentração abaixo de 10% (Anexo II). Apesar da alta concentração de mentol o mesmo só apresentou resultado frente *Salmonella typhi* em concentração igual a 5,00 mg/mL, sendo então considerado com baixa atividade antimicrobiana frente as bactérias estudadas.

Tanto os óleos essências de pimenta malagueta quanto de capim limão apresentaram resultados apenas nas concentrações mais altas. O capim limão inibiu o crescimento de todas as bactérias estudadas, nas concentrações de 5,00 e 2,50 mg/mL, este possui como componentes majoritários o geranial (46,1%) e neral (29,5%) (Anexo III) e de acordo com Valeriano et al. (2012) a moderada atividade registrada pode ser atribuída à baixa afinidade entre componentes menos polares, (neral e geranial) (Figura 11) e o substrato polar (meio de cultura), o que pode diminuir atividade do óleo essencial.

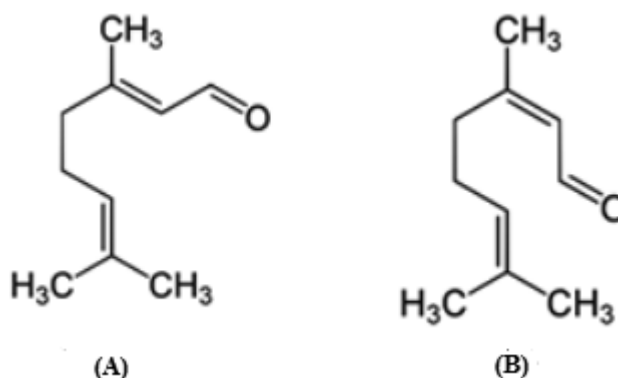


Figura 11: Estrutura química (A) geranial e (B) neral.

Fonte: Rocha (2012).

Em relação aos conservantes utilizados neste estudo, todos apresentaram efeito antimicrobiano, sendo que o metabissulfito de sódio foi o que apresentou melhores resultados (Tabela 3).

**Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (mg/ml) dos conservantes químicos.**

	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Benzoato de sódio	15,00	7,50	7,50	7,50
Metabissulfito de sódio	1,88	1,88	1,88	3,75

A resolução da ANVISA RDC N° 8, de 6 de março de 2013, dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para produtos de frutas e de vegetais e geleia de mocotó. De acordo com esta resolução o limite máximo para o benzoato de sódio, é de 1,00mg/100g ou mg/100mL, para qualquer formulação, já para o metabissulfito de sódio o limite máximo varia de 0,05 a 1,00mg/100g ou mg/100mL dependendo da formulação a qual será aplicada.

Outra resolução da ANVISA RDC N° 5, de 4 de fevereiro de 2013, que aprova o uso de aditivos alimentares com suas respectivas funções e limites máximos para bebidas alcoólicas (exceto as fermentadas). Nesta o limite máximo para o benzoato de sódio, é de 0,50mg/100g ou mg/100mL e para o metabissulfito de sódio o limite máximo permitido varia de 0,2 a 0,35mg/100g ou mg/100mL.

Segundo a ANVISA através do Relatório de Contribuições da CP 04/2011 o benzoato de sódio é o aditivo mais efetivo para a conservação de sucos e néctares de fruta, e o metabissulfito de sódio é o aditivo mais efetivo para a conservação de água de coco e suco/néctar de caju.

Os conservantes avaliados apresentaram resultados de concentração inibitória mínima (CIM), superior ao máximo estipulado pela ANVISA para a sua utilização. Sendo assim conclui-se que ambos se mostram ineficaz para inibição das bactérias estudadas, quando aplicada nos alimentos.

#### 4.1.2 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Com os resultados da concentração inibitória mínima (CIM), buscou-se obter a concentração bactericida mínima (CBM).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Concentração bactericida mínima (mg/ml) dos óleos essenciais de capim limão, hortelã do campo e pimenta malagueta e dos extratos de folhas de pitanga e casca de romã.**

	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Capim limão	5,00	5,00	5,00	5,00
Hortelã do campo	SR	5,00	SR	SR
Pimenta malagueta	2,50	SR	SR	5,00
Folhas de pitanga	2,50	SR	SR	5,00
Casca de romã	1,25	5,00	5,00	2,50

Legenda: (SR) sem resultados, os mesmos não apresentaram resultados dentro das concentrações estudadas.

Assim como ensaio para a determinação da CIM, o extrato bruto da casca de romã foi o que gerou o melhor resultado, no entanto, frente a *Bacillus cereus*, a CIM foi de 0,63mg/mL e a CBM, de 1,25mg/mL. Também houve aumento na concentração do extrato frente a *Staphylococcus aureus*, que apresentou CIM de 0,63mg/mL mas, CBM de 2,50mg/mL. Isso ocorre devido a diluição do agente antimicrobiano no teste de concentração bactericida mínima, o que possibilita o crescimento da bactéria, concluindo assim que na concentração testada houve apenas a inibição do crescimento (Bacteriostático), caso não ocorra o crescimento, determina-se que a concentração é bactericida, ou seja, levou a morte da bactéria.

#### 4.1.3 Testes de associação dos extratos com conservantes químicos

Atualmente vários estudos têm sido realizados para avaliar possíveis sinergismos envolvendo os produtos naturais. Mandalari et al (2010) estudaram o potencial antimicrobiano dos polifenóis extraídos da pele de amêndoas, demonstrando algumas interações sinérgicas

frente a *Samonella enterica* e *Staphylococcus aureus*. Rocha (2012) obteve resultados que comprovam o efeito sinérgico causado pela associação do óleo essencial de *Lippia alba* II com a Oxacilina, reduzindo de forma significativa a CIM do mesmo. Fernandes et al (2012) observaram efeitos sinérgicos de *Psidium guineense* (araça-do-campo) em combinação com agentes antimicrobianos sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina. Puhl et al (2011) verificaram sinergismo com extrato bruto e frações de *Piper audichaudianum* com antibióticos de diferentes classes (ceftriaxona, vancomicina e tetraciclina). Estes estudos demonstraram que os extratos e óleos essenciais de plantas não apenas possuem propriedades antibacterianas, mas também possuem a capacidade de interferir na atividade antimicrobiana de outras substâncias.

Neste estudo foi possível observar que apenas para a associação do extrato da casca de romã com o benzoato de sódio frente a *Staphylococcus aureus* os resultados da CIM combinado permaneceram os mesmos da CIM isolado (Apêndice I). As demais associações apesar de diminuir as suas concentrações em relação a CIM isolado apenas apresentaram sinergismo ( $FICI \leq 0,50$ ) nas associações contendo extrato de casca de romã, tanto com benzoato de sódio frente a *Salmonella typhi*, quanto para o metabissulfito de sódio frente a *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*, como pode ser visto na Tabela 5.

**Tabela 5 - resultados do teste de associação dos extratos da casca de romã e folhas de pitanga com os conservantes Metabissulfito de sódio e benzoato de sódio.**

	<i>Bacillus Cereus</i>			<i>Salmonella typhi</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	CIM <sub>c</sub> (µg/mL)	FIC	FICI	CIM <sub>c</sub> (µg/mL)	FIC	FICI	CIM <sub>c</sub> (µg/mL)	FIC	FICI
<b>Folhas de pitanga + benzoato de sódio</b>	–	–	SR	–	–	SR	–	–	1,00
Folhas de pitanga	SR	SR	–	SR	SR	–	625,00	0,50	–
Benzoato de sódio	SR	SR	–	SR	SR	–	3750,00	0,50	–
<b>Folhas de pitanga + metabissulfito de sódio</b>	–	–	SR	–	–	SR	–	–	1,00
Folhas de pitanga	SR	SR	–	SR	SR	–	312,50	0,50	–
Metabissulfito de sódio	SR	SR	–	SR	SR	–	937,50	0,50	–
<b>Casca de romã + benzoato de sódio</b>	–	–	1,00	–	–	0,38	–	–	2,00
Casca de romã	312,50	0,50	–	312,50	0,25	–	625,00	1,00	–
Benzoato de sódio	3750,00	0,50	–	1875,00	0,13	–	7500,00	1,00	–
<b>Casca de romã + metabissulfito de sódio</b>	–	–	0,75	–	–	0,31	–	–	0,38
Casca de romã	312,50	0,50	–	78,12	0,06	–	78,12	0,13	–
Metabissulfito de sódio	468,75	0,25	–	468,70	0,25	–	468,70	0,25	–

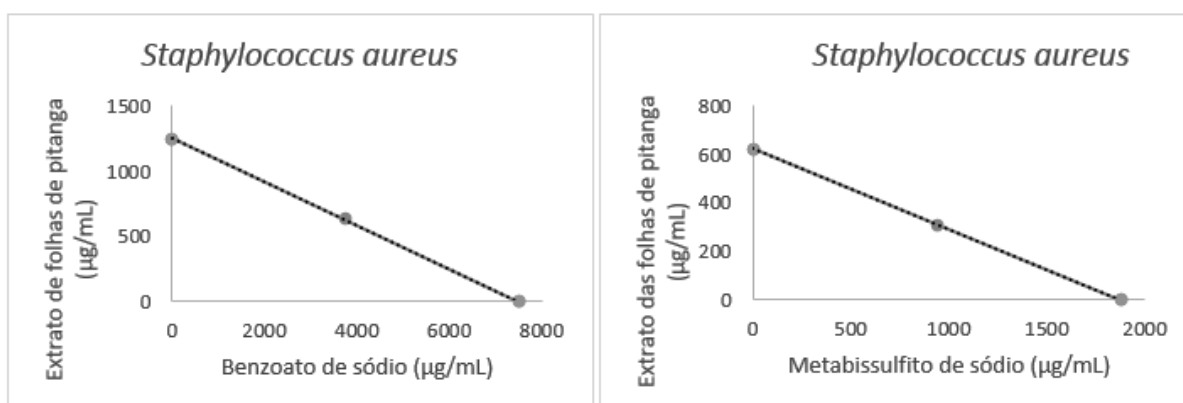
**Legenda: (SR) sem resultado, não realizou-se teste de associação.**



Nota: CIMc: representa a concentração inibitória mínima quando combinada; FIC: representa a concentração fracionada inibitória, dado pela razão da CIMc (concentração inibitória mínima combinada), pela CIMi (concentração inibitória mínima isolada); FICI: representa o índice de concentração fracional inibitória. As áreas em verdes representam as combinações que houve sinergismo ( $FICI \leq 0,50$ ).

Também é possível determinar o tipo de interação das associações entre os extratos e os conservantes através do isoblograma, que é um gráfico que relaciona as concentrações dos produtos da associação. Para isso foram construídos os mesmos utilizando as combinações nas quais não foi verificado crescimento microbiano no método do “checkerboard”.

Nos Gráficos (Figuras 12 e 13), a não interação (efeito indiferente  $FICI=1,00$ ) resulta em uma linha reta, os pontos posicionados abaixo indicam efeito sinérgico ou aditivo e para aqueles situados acima, o efeito é antagônico (ROSATO et al., 2007).



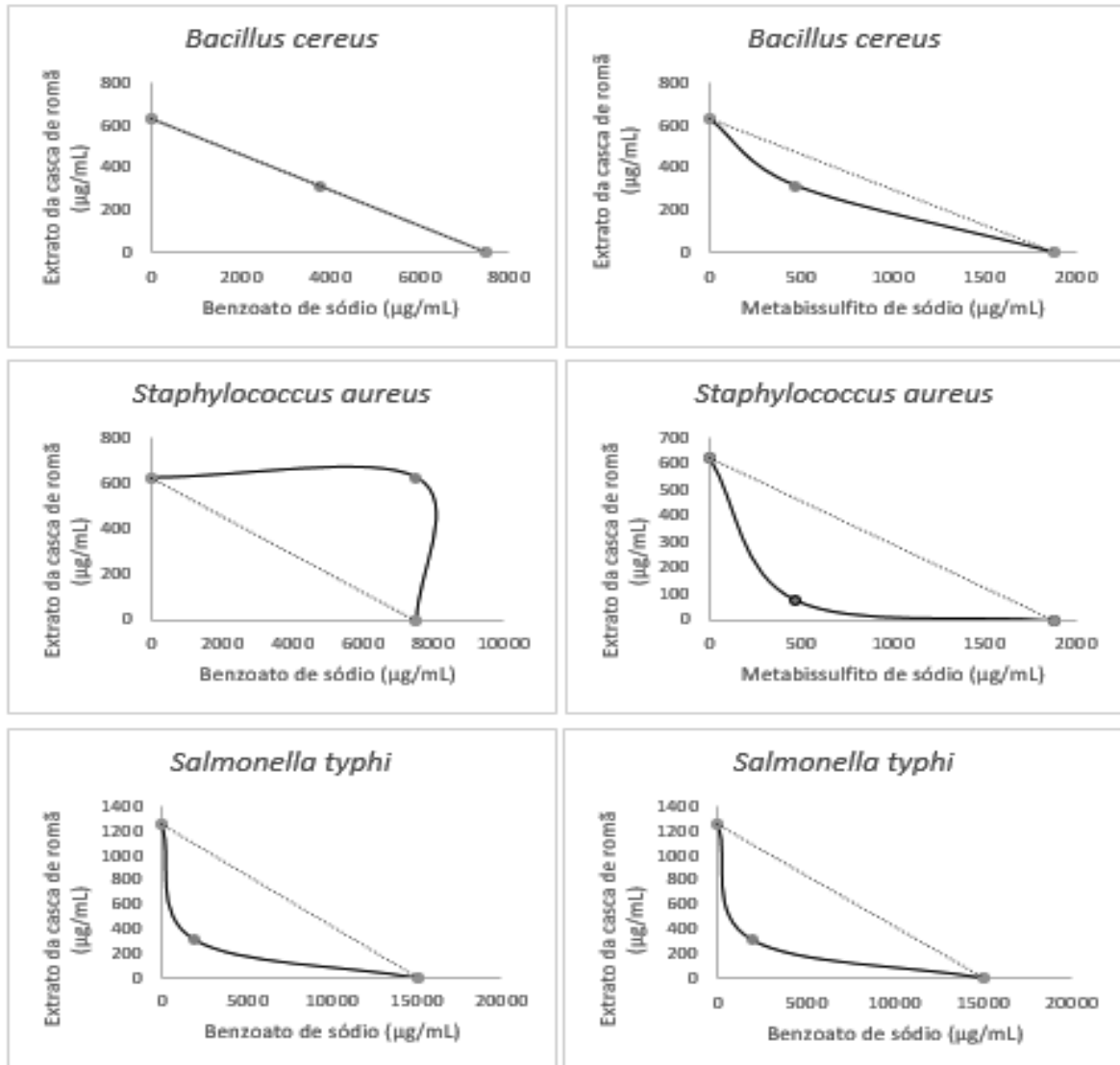
**Figura 12: Isobologramas das associações dos conservantes com o extrato das folhas de pitanga.**

**Fonte: Autoria própria**

Os isobologramas confirmam que não ocorre interação entre o extrato das folhas de Pitanga com os conservantes benzoato de sódio e metabissulfito de sódio, ou seja, o ponto onde representa as menores concentrações onde houve inibição do crescimento da *Staphylococcus aureus*, através da inspeção visual, ficou localizado exatamente sobre a linha tracejada.

Resultados diferenciados podem ser observados nas associações dos conservantes com o extrato da casca de romã, onde claramente é possível observar que houve efeito

sinérgico em três associações diferentes duas com o metabissulfito de sódio frente as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*, e uma com o benzoato de sódio, frente a cepa de *Salmonella typhi*. Também é possível observar que houve antagonismo na associação com o benzoato de sódio, frente a cepa de *Staphylococcus aureus* (Figura 13).



**Figura 13:** Isobogramas das associações dos conservantes com o extrato das cascas de romã.

Fonte: Autoria própria.

Na associação do Extrato da casca de Romã com o Metabissulfito de sódio frente a cepa da bactéria *B. cereus*, é possível observar que o ponto onde passa a curva está abaixo da reta de indiferença, porém muito próxima, isso ocorre quando o efeito apresentado é de

aditividade onde o valor FICI encontra-se entre 0,60 - 0,90, neste caso o valor do ponto equivale a 0,75 como mostrado na Tabela 5.

## 4.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.2.1 Determinação da Atividade antioxidante pelo método DPPH

Através do espectrofotômetro UV-Vis, realizou-se a leitura da solução padrão de DPPH 90 $\mu$ M no comprimento de onda de 515nm e obteve-se 0,979 como valor de absorbância, essa foi utilizado como referência para a leitura das amostras.

As amostras foram feitas em triplicadas, por isto calculou-se a média dos valores obtidos de absorbância, assim como o desvio padrão ( $\sigma$ ) para esses resultados (Tabela 6).

Utilizando a Equação (2) calculou-se a porcentagem de inibição (PI) no qual determina o grau de descoloramento da solução padrão de DPPH, que perde sua coloração violeta e torna-se amarela, devido à capacidade do antioxidante em sequestrar o radical livre, com isso ocorre a diminuição do valor de absorbância (POVH, 2008).

**Tabela 6 - porcentagem de inibição dos óleos essenciais de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos das folhas de pitanga e casca de romã em cada concentração estudada**

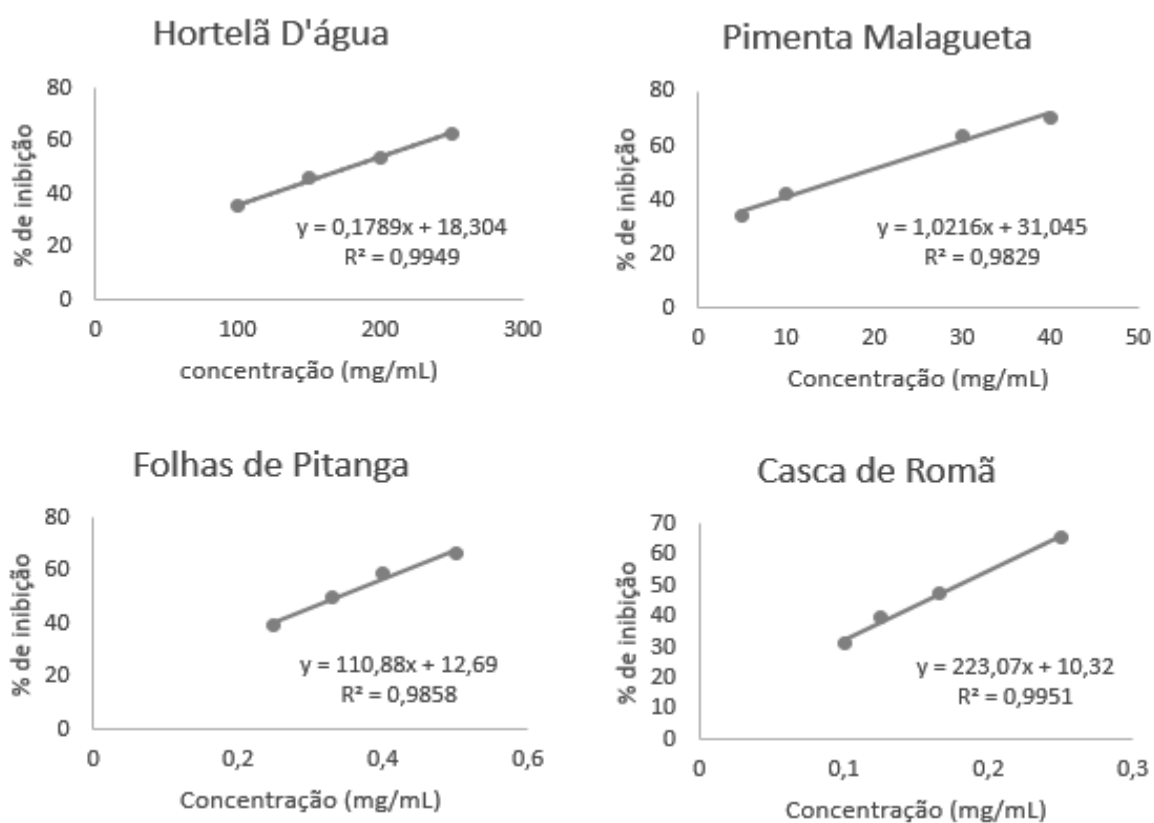
(continua)

Plantas	Concentrações (mg/mL)	% de inibição (PI)
Hortelã d'água	100	35,54
	150	46,32
	200	53,63
	250	62,92
Pimenta malagueta	5	34,27
	10	42,66
	30	64,08
	40	70,00

**Tabela 7 - porcentagem de inibição dos óleos essenciais de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos das folhas de pitanga e casca de romã em cada concentração estudada**

		(conclusão)
Casca de romã	0,10	31,51
	0,125	39,58
	0,166	47,29
	0,25	65,88
Folhas de pitanga	0,25	39,38
	0,33	49,74
	0,40	58,83
	0,50	66,90

Plotou-se os resultados em gráficos a fim de se obter uma curva linear entre a concentração do antioxidante e sua a porcentagem de inibição e através deles obteve-se a equação da reta e o coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) como mostra a Figura 14.



**Figura 14: Gráficos da atividade antioxidante dos óleos essenciais de hortelã d'água e pimenta malagueta e dos extratos das folhas de pitanga e cascas de romã.**

Fonte: Autoria própria.

Através das equações obtidas nos gráficos determinou a concentração que equivale a 50% de inibição (IC<sub>50</sub>), os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 8: concentração do antioxidante que reduz metade dos radicais de DPPH (IC<sub>50</sub>).**

<b>Plantas</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mg/mL)</b>
Hortelã d'água	177,17
Pimenta malagueta	18,91
Casca de romã	0,18
Folhas de pitanga	0,34

Os resultados apresentados mostram que os extratos, tanto da casca de Romã, quanto das folhas de Pitanga são as que possuem maior atividade antioxidante, quando comparada com os óleos em estudo.

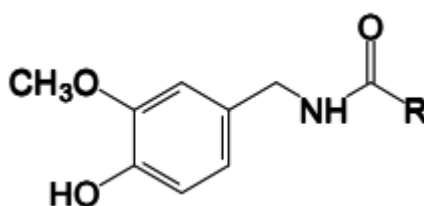
Kumar; Mahrshwari e Singh (2008) observaram na pesquisa com camundongos que a administração com extrato de romã e vitamina C reduziu os níveis de peroxidação lipídica e aumentou o nível de glutathione no tecido cerebral. A glutathione possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativos, com isso o aumento desta substância no tecido cerebral pode prevenir a uma série de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer ou de Parkinson (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; DEGÁSPARI; DUTRA, 2011).

Ambos extratos em estudo são ricos em compostos bioativos que são responsáveis pela sua grande atividade antioxidante tais como os compostos fenólicos como as antocianinas que possuem mecanismo de ação semelhante ao da vitamina C, vitamina E e betacaroteno. Além disso, também possui ácidos fenólicos, flavonóis carotenoides e taninos, no caso da casca de romã se destaca a punicalagina que é considerada um potente antioxidante (LANSKY; NEWMAN, 2007; BARROS, 2011, PRADO; 2009). Pande e Akoh (2009) ao avaliarem a capacidade antioxidante e o perfil lipídico da romã mostraram que a é na casca

onde tem o maior teor de taninos hidrolisáveis. Esses estudos comprovam os resultados positivos encontrados.

Ensaio farmacológico realizado com os extratos das folhas da *Eugenia uniflora* (pitanga) permitiram evidenciar atividade inibitória da enzima xantina-oxidase, que é responsável por gerar espécies reativas de oxigênio, ou seja, radicais livres, e a inibição desta enzima deve-se pela ação dos flavonoides presentes nas folhas (SCHMEDA - HIRSCHMANN; THEODULOZ; FRANCO, 1987).

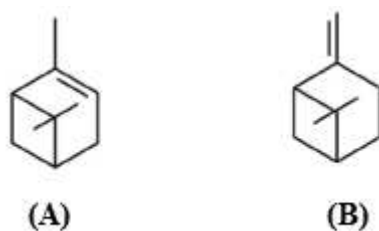
Em relação ao óleo essencial de pimenta malagueta Costa et al. (2009) destacam que a atividade antioxidante pode ser explicada pela considerável concentração de fenólicos totais e capsaicinóides presentes, os quais possuem grande capacidade de doar elétrons ao radical DPPH e estabilizá-lo. De acordo com a cromatografia (Anexo IV), o óleo essencial de pimenta malagueta estudada apresenta 5% de capsaicinóides (Figura 15), eles são os responsáveis pela pungência ou picância das pimentas do gênero *Capsicum*.



**Figura 15:** Estrutura química típica de capsaicinóides, onde R representa cadeias carbônicas alifáticas que podem ser substituídas.

**Fonte:** Souza (2012).

O óleo essencial de hortelã d'água, apesar de apresentar resultados dentro da faixa de concentrações estudadas, o resultado obtido (177,17mg/mL) é consideravelmente alto. Podemos dizer que o resultado se deve a presença  $\alpha$ -pineno (0,3%),  $\beta$ -pineno (1,5%), (Figura 16) como mostrado em (Anexo V). Porém de acordo com Ruberto e Baratta (2000) essas substâncias juntamente com o,  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno apresentam baixa atividade, sendo, entretanto, capazes de aumentar a atividade ao agir sinergicamente com outros compostos.



**Figura 16:** Constituintes do óleo essencial de hortelã d'água. (A)  $\alpha$ -pineno, (B)  $\beta$ -pineno.

**Fonte:** Lima e Cardoso (2007).

Os óleos essenciais de capim limão e erva doce não apresentaram resultados dentro das concentrações estudadas, ou seja,  $IC_{50} > 250\text{mg/mL}$ .

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos se mostraram muito bons em relação a atividade antimicrobiana, onde os extratos das cascas de romã e das folhas de pitanga, se mostraram mais eficientes quando comparados aos óleos essenciais estudados.

Quando associou-se o metabissulfito de sódio com o extrato da casca de romã, houve uma redução da concentração inibitória mínima de 87,5% frente a *Staphylococcus aureus* passando de 3,75 mg/mL para 0,49 mg/mL. Nas demais associações realizadas obteve-se resultados entre 50 e 75% de redução da CIM (exceto a combinação benzoato de sódio + casca de romã + *Staphylococcus aureus*, onde não observou redução na CIM). Conclui-se assim que a associação entre conservantes e produtos naturais, são uma grande alternativa para as indústrias alimentícias, devido a eficácia na redução da utilização dos conservantes sintéticos.

Em relação ao teste da atividade antioxidante dos extratos e óleos essenciais testados, também é possível concluir que os resultados obtidos se mostraram muito eficazes.

No método de sequestro de radicais livres de DPPH, assim como nos testes microbiológicos os extratos apresentaram resultado melhores, ou seja, com maior atividade antioxidante, seguido pelo óleo essencial de pimenta malagueta, porém ambos podem ser considerados com grande potencial antioxidante.

De forma geral, os resultados deste estudo confirmam o potencial antioxidante e antimicrobiana de algumas plantas, podendo estes ser realizados testes para utilização na indústria alimentícia, como uma forma alternativa de obtenção de alimentos mais saudáveis, com redução ou livres de aditivos sintéticos.



## REFERÊNCIAS

ABDULMUMEEN, Hamid A.; RISIKAT, Ahmed N.; SURURAH, Agboola R. **Food: Its preservatives, addtives and applications**. Ilorin, Nigéria. International Journal of Chemical and Biochemical Sciences, v. 1, p. 36-47, 2012.

ABRAHAM, S. K. **Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice**. Food Chemical Toxicology, v. 39, p. 493-498, 2001.

ALMEIDA, Priscilla Prates de. **Extração do óleo essencial de Hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão**. 2006. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ALVES, A.R.F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2002. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciência da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

ANAND; S.P.; SATI; N. **Artificial preservatives and their harmful effects: looking toward nature for safer alternatives**. Uttarakhand, India. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 4, 2013.

ANIBAL, Paula Cristina. **Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de *Punica granatum* L. (romã) sobre *Candida* ssp**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental). Universidade Estadual de Campinas , Piracicaba, 2010.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 8, DE 06 DE MARÇO DE 2013**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1cac3e004edacb17a9e8ab8a610f4177/RDC+N+08++2013+Aditivos+frutas+e+vegetais.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 10 jun. 2015.

ANVISA. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC N° 5, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2013**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7c1967004e8ad8b9a2f3a28a610f4177/Bebidas+Alco%C3%B3licas+n%C3%A3o+fermentadas+rdc0005\\_04\\_02\\_2013.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7c1967004e8ad8b9a2f3a28a610f4177/Bebidas+Alco%C3%B3licas+n%C3%A3o+fermentadas+rdc0005_04_02_2013.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 10 jun. 2015.

ANVISA. **Relatório de Contribuições da CP 04/2011**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f69e1d804edcd4a3aa2eaa8a610f4177/Relat%C3%B3rio+Final+CP+04+2011+Parte+2.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 10 jun 2015.

ARAÚJO, J. M. A. **Conservadores químicos em alimentos**. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.24, p.192-210, 1990.

ARAÚJO, Sthéfane G.; MORAIS, Marcela I.; PINTO, Maria Eduarda A.; COELHO, Fernanda Viera; RIBEIRO, Rodrigo Resende; JÚNIOR, Carlos Alan Dias; LIMA, Luciana A. R. Santos. **Avaliação da atividade antioxidante de *Mentha sp.*** 1º Congresso de Farmácia da UFSJ. Divinópolis, 20, 21 e 22 out. 2010.

AUN, Marcelo V.; MAFRA, Cynthia; PHILIPPI, Juliano C.; KALIL, Jorge; AGONDI, Rosana C.; MOTTA, Antônio A. **Aditivos em Alimentos**. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, v.34, n. 5, p.177-186, 2011.

AVIRAM M.; ROSENBLAT M.; GAITINI D.; NITECKI S.; HOFFMAN A.; DORNFELD L. **Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation**. Clinical Nutrition. 23: 423–33; 2004.

AVIRAM, M.; VOLKOVA, N.; COLEMAN, R.; DREHER, M.; REDDY M.K.; FERREIRA D. **Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: Studies in vivo in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and in vitro in cultured macrophages and lipoproteins**. Journal Agric Food Chem. 56: 1148–57, 2008.

BAGETTI, Milena. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-Rio Grande do Sul, 2009.

BARBOSA, Lidiane Nunes. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado - Curso de Biologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010.

BARBOSA, Mariângela de Araújo. **Avaliação da atividade antimicrobiana “*In vitro*” da *Punica granatum* Linn. Frente à *Enterococcus faecalis* isolados clinicamente**. 2010. 73 f. Trabalho de conclusão de curso de graduação em odontologia – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

BARBOSA, Danilo Batista Martins. **Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus***. 2011. 93f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

BARROS, Zilmar Meireles Pimenta. **Cascas de frutas tropicais como fonte de antioxidante para enriquecimento do suco pronto**. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2011.

BELTRAME, Jeovandro Maria; LOBO, Viviane da Silva; DOTTO, Flavia; MARQUES, Karin Becker; ANGNES, Ricardo Almir. **Estudo de obtenção de óleos essenciais e fatores de influência em sua composição**. Anais do II ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica- Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), 20 - 22 de Outubro de 2010.

BRESOLIN, Bruna Maria Zvolinski; DALL’STELLA, Julia K.; SILVA, Sérgio Eduardo Fontoura da. **Pesquisa sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mão de manipuladores de alimentos em Curitiba/Paraná/Brasil**. Revista Estudo da Biologia- PUC-PR, v.27, n. 59, p.27-32. Curitiba, abr./jun., 2005.

BRUN, G. R.; MOSSI, A.J. **Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. Erechim. Revista Perspectiva, v.34, n. 127, p.135-142, set. 2010.

CARDOSO, Susana; RUBENSAM, Jane Maria. **Elaboração e avaliação de projetos para agroindústrias**. Editora: UFRGS, 1ª edição. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Curso de Graduação Tecnológica – Planejamento e Gestão para o Desenvolvimento Rural do SEAD/UFRGS, Porto Alegre, 2011.

CASTEJON, Fernanda Vieira. **Taninos e Saponinas**. 2011, 29f. Seminário, Programa de pós-graduação em Ciência Animal da escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, 2011.

CASTRO, Ricardo Dias de. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) e de suas associações com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida***. 2010. 68f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2010

CHAINY, G. B.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. **Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- $\kappa$ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis**. Oncogene, v.19, p. 2943-2950, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A8: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, PA, USA, 2008.

COSTA, Luciene Mendonça da; MOURA, Neusa Fernandes de; MARANGONI Cristiane, MENDES Caroline Eliza; TEIXEIRA, Alexandre de Oliveira. **Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum***. Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 30, Campinas, 2009.

COSTA, Adriana Barbosa. **Atividade antioxidante *in vitro* e antifúngica do Noni (*Morinda citrifolia* L.)**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade de Piauí. Teresina, 2011.

COSTA, Andyara Lena dos Santos. **A Microbiologia dos Alimentos e a Importância dos Microrganismos Úteis, Deteriorantes e Patogênicos**. Universidade Anhembi Morumbi. Disponível em: < [http://conteudo.anhembi.br/ead/conteudo/tec\\_gastronomia/Microbiologia\\_e\\_Higiene\\_Alimentar/unidade\\_1/1.pdf](http://conteudo.anhembi.br/ead/conteudo/tec_gastronomia/Microbiologia_e_Higiene_Alimentar/unidade_1/1.pdf)>. Acesso em 10 jun. 2014

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; DUTRA, Ana Paula Chaves. **Propriedades fitoterápicas da romã (*Punica granatum* L.)**. Visão Acadêmica, v.12, n.1, p. 36-46, Curitiba, Jan. - Jun. 2011.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. **Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício; SANTOS, Ricardo José dos; GENOVESE, Maria Inês, LAJOLO, Franco Maria. **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•**. Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 2, n. 2, p. 446-452, Campinas, abr.-jun. 2006.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. **Anti-candida activity of brazilian medicinal plants**. Journal Ethnopharmacol. p.305-311, 2005.

DUARTE, Rafael Severino. **Microrganismos mais frequentemente encontrados com limites acima dos aceitáveis, segundo a RDC nº 12/2001 da ANVISA em produtos de origem animal, registrados junto à Cispoa**. 2012, 43f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DUVOIX, A.; DELHALLE, S.; BLASIUS, R.; SCHNEKENBUGER, M.; MORCEAU, F.; FOUGERE, M.; HENRY, E.; GALTEAU, M. M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. **Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition**. Biochemical Pharmacology, v. 68, p. 1101-1111, 2004.

ENDO, Eliana Harue. **Efeito antifúngico de extrato bruto e frações de *Punica granatum* contra *Candida albicans* e sinergismo com fluconazol.** 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêutica. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2007.

FALCÃO, Manuel Alves; PEREIRA, Marcos Aurélio Almeida; MILÃO, Denise. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos Óleos essenciais de *Cymbopogum winterianus* e *Cymbopogum citratus* pelo método de Bioautografia indireta.** X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009

FAVERO, Diego Matos; RIBEIRO, Cilene da Silva Gomes; AQUINO, Arislete Dantas de. **Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população.** Campinas. Revista Segurança Alimentar e Nutricional, v.18, n. 1, p 11-20, 2011.

FERNANDES, T. G. et al. **In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.** The Scientific World Journal, London, v. 2012, p. 158237, Apr. 2012.

FRANCO, Robson Maia. ***Escherichia coli*: ocorrência em suínos abatidos na grande rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo toscana.** 2002. 144f. Tese de Doutorado (Programa de pós-graduação em medicina veterinária) Universidade Federal Fluminense, Niterói – Rio de Janeiro, 2002.

FREIRE, R. S.; MORAIS, S. M.; CATUNDA-JUNIOR, F. E.; PINHEIRO, D. C. **Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds.** Bioorg Med Chem, v.13, n. 13, p. 4353-4358, 2005.

FURUHATA K.; DOGASAKI, C.; HARA, M.; FUKUYAMA, M. **Antibacterial activities of several herbes on *Legionella Pneumophila*.** Journal Azabu Univ., v. 1, n. 2, p. 15-20. 2000.

GIL M. I.; TOMAS-BARBERAN F. A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT D. M.; KADER, A. A. **Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 48 p. 4581-4589, 2000.

GOMES, Ligia Portugal; RODRIGUES, Maura Menezes; SOARES, Gabriela; BARONI, Francisco de Assis; SOUZA, Miliane Moreira Soares de. ***Bacillus cereus* em amostras de doce industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de Seropédica e Itaguaí-RJ.** Rio de Janeiro. Revista Universitária Rural, série ciência da vida, Editora da UFRRJ, v. 24, n. 2, p. 181-184, jul./dec., 2004.

GOMES, Chrystian Philipe Raphael; SILVA, Elaine Santos; SILVA, Marley Garcia; PRINCE, Karina Andrade. **Avaliação da atividade anti-Staphylococcus aureus dos taninos da *Punica granatum* (romã) utilizando a técnica do REMA.** USP DIGITAL disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2834&numeroEdicao=17>> Acesso em 20 mai. 2014.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A. Alves; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** São Paulo. Revista Arquivos do Instituto Biológico, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set. 2005

GUERREIRO, Renata de Souza; SÁ, Matheus Santos de; RODRIGUES, Letícia de Alencar Pereira. **Avaliação do teor de nitrito e nitrato em alimentos cárneos comercializados em Salvador.** RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade, v. 5, n. 1, p. 77-91, fev. 2012.

GULÇIN, I.; OKTAY, M.; KUFREVIOGLU, O. I. **Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts.** Food Chem, v. 83, n. 3, p. 371-382, 2003.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. **Glutathione e enzimas relacionadas: Papel biológico e importância em processos patológicos.** Revista Quimica Nova, V. 31, N. 5, p. 1170-1179, 2008.

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, F. **Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, p. 3943-3946, 2002.

JARDINI, Fernanda Archilla. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) – Participação das frações de ácidos fenólicos nos processos de inibição da oxidação.** 2005. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

JARDINI, Fernanda Archilla. **Atividade dos compostos fenólicos antioxidantes da romã (*Punica granatum*, L.) – avaliação *in vivo* e em cultura de células.** 2010. 93f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos – Área de Bromatologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

KAWASE, Kátia Yuro Fausta; COELHO, Gerson Luiz Vieira; LUCHESE, Rosa Helena. **Uso de conservadores ácido Benzoico e Benzoato de Sódio no controle de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em suco de laranja.** Revista de Ciências da Vida - UFRRJ, v. 28, n. 2, p. 53-62, jul./dez. 2008.

KENDALL, P. **Bacterial Foodborne Illness**. Colorado State University. Disponível em: <<http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09300.pdf>>. Acesso em 23 jun. 2014.

KUMAR, S.; MAHESHWARI, K.K; SINGH, V. **Protective effects of Punica granatum seeds extract against aging and scopolamine induced cognitive impairments in mice**. African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines, v.6, n.1, p.49-56, 2008

LANSKY, P.; NEWMAN, R. A. **Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer**. Journal of Ethnopharmacology, Limerick, v. 109, p.177-206, 2007.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. **Família Lamiaceae: Importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante**. Revista Fitos. v. 3, N. 3, p. 14-24, set. 2007.

MACHADO, Rita Margarete Donato; TOLEDO, Maria Cecília Figueiredo; VICENTE, Eduardo. **Sulfitos em Alimentos**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 9, n. 4, p. 265-275, out./dez. 2006.

MACHADO, Terezinha Feitosa; PEREIRA, Rita de Cássia Alves; SOUSA, Civita Teixeira de; BATISTA, Valéria Chaves Vasconcelos; PEREIRA, Iana Maria Cristino. **Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial de Capim-Limão**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa, ISSN 1679-6543, Nov. 2012.

MACHADO, Terezinha Feitosa; BORGES, Maria de Fátima; BRUNO, Laura Maria. **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos**. Documento Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184, 145, 2011.

MAHADY, G. B.; PENDLAND, S. L.; STOIA, A. **In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders**. Phytoter Res, v. 19 p. 988-991, 2005.

MALVEZZI, Cristiane Karina. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações**. 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências – Conversão de Biomassa). Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

MILANI, Liana Inês Guidolin. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de caqui (Diospyros kaky L.) para proteção de produtos cárneos**. 2012. 169 f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MANDALARI, G. et al. **Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins.** Letters in Applied Microbiology, Malden, v. 51, n. 1, p. 83-9, Jul 2010.

MIRANDA, Cíntia Alvarenga Santos Fraga de. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas.** 2010. 150 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A. C.; DA SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J. H. **Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species.** Revista Química Nova, v. 29, n. 5, 2006.

MUKHERJEE, P. K. et al. **Combination treatment of invasive fungal infections.** Clinical Microbiology Reviews, Washington, v. 18, n. 1, p. 163-94, Jan 2005.

NIMRI, Laila F.; MEQDAM, M. M.; ALKOFABI, A. **Antibacterial Activity of Jordanian Medicinal Plants.** Pharmaceutical Biology. v.37, p. 196-20, Jordan, 1999.

OLIVEIRA, Cibele Braga de; SOARES, Diana Gabriela de Sousa; PAULO, Marçal de Queiroz; PADILHA, Wilton Wilney Nascimento. **Atividade antimicrobiana *in vitro* da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre bactérias cariogênicas.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v. 12, n. 3, p. 239-250, 2008.

OLIVEIRA, Adolfo Marcito Campos de. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* ssp.** 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011.

PANDE G.; AKOH C.C. **Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgiagrown pomegranate cultivars.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 20, p. 9427-9436, 2009.

PEIXOTO, Erika Cosendey Toledo Mello; MOREIRA, Giovanna Melatti Bernal; MATSUMOTO, Leopoldo Sussumu; SILVA, Regildo Márcio Gonçalves; DOMINGUES, Paulo Francisco. **Extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolado de leite bovino.** Resumos do I Congresso Paranaense de Agroecologia – Pinhais/PR – 29 e 30/05/2014.

PEREIRA, Cristiane Aparecida; VILELA, Polyana das Graças Figueiredo; OLIVEIRA, Luciane Dias de; JORGE, Antonio Olavo Cardoso. **Ação antimicrobiana *in vitro* de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L.** Rev Inst Adolfo Lutz, v. 68, n. 1, p. 102-108, 2009.



PINTO, Angelo C.; CORRÊA, Marilza B. **Romã: da Antiguidade ao uso atual na medicina popular.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/filiais/adm/Upload/subconteudo/pdf/Hist%F3rias%20Interessantes%20de%20Produtos%20Naturais14.pdf>>. Acesso em 10 mai. 2014.

POVH, Juliana A. **Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas.** 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

PRADO, Adna. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais.** 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2009.

PROBST, Isabella da Silva. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico.** 2012. 102 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2012.

PUHL, M. C. M. N. et al. **Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics.** *Molecules*, Basel, v. 16, n. 12, p. 9925-38, Dec 2011.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** *Revista Química Nova*, V. 29, N. 4, p. 755-760, 2006.

REBELO, Monaliza M.; SILVA, Joyce Kelly R. da; ANDRADE, Eloísa Helena A.; MAIA, José Guilherme S. **Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 1B, p. 230-235, Jan./Mar. 2009.

ROCHA, Ronicely Pereira. **Avaliação do teor e da composição do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* submetidos a processos de secagem e armazenamento.** 2011. 149 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ROCHA, Larissa Queiroz. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) N.E. Brown na atividade antimicrobiana da Oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* Oxacilina-resistente.** 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RODRIGUES, Tatiana Trarbach. **Revisão bibliográfica da utilização de bactericidas como conservantes alimentícios na última década.** 2010. 73 f. Monografia (Conclusão de curso de Bacharel em Farmácia). Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, 2010.

ROSATO, A., et al. **Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin.** *Phytomedicine*, v.14, p. 727-732, 2007.

ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*.** 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

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

RUFINO, Maria do Socorro Moura; ALVES, Ricardo Elesbão; BRITO, Edy Sousa de; MORAIS, Selene Maia de; SAMPAIO, Caroline de Goes; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURACALIXTO, Fulgencio Diego. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH.** Comunicado Técnico Embrapa. ISSN 1679-6535 Fortaleza, jul. 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*, v. 35, p. 275-280, 2004.

SARTORI, Mara Rúbia Keller. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae).** 2005, 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHMEDA – HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L. **Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* L.: xanthine oxidase inhibitory activity.** *Journal Of Ethnopharmacology*, v. 21, p.183-186, 1987.

SCHUCK, Virna J. A.; FRATINI, Marisa; RAUBER, Cristiane S.; HENRIQUES, Amélia; SCHAPOVAL, Elfrides E. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 1, jan./abr., 2001.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. **Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 121, p. 123-138, 2008.

SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, M.S.V. **Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus***. Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 209-212, abr/ jun 2008.

SILVA, Nathália Cristina Cirone. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA, Carla da; MONTEIRO, Maria Lúcia Guerra; RIBEIRO, Roberta de Oliveira Resende; GUIMARÃES, Carlos Frederico Marques; MANO, Sérgio Borges; PARDI, Henrique Silva; MÁRSICO, Eliane Teixeira. **Presença de aditivos conservativos (nitrito e sulfito) em carnes bovinas moídas, comercializadas em mercados varejistas**. Revista Brasileira de Ciência Veterinária, v. 16, n. 1, p.33-36, jan./abr. 2009.

SILVA, Bruno Toledo; ANJOS, Carolina dos; NOVO, Sylvia Marquart Fontes; MATSUMOTO, Leopoldo Sussumu; PEIXOTO, Erika Cosendey Toledo de Mello; SILVA, Luciana Pereira; SILVA, Regildo Márcio Gonçalves da. **Atividade antimicrobiana in vitro de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino**. Biosci. J., v. 29, n. 4, p. 974-984, Uberlândia, July/Aug, 2013

SINGH R.P.; MURTHY K.N.C.; JAYAPRAKASHA G.K. **Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models**. Journal Agric Food Chem. v. 50, p 81– 86, 2002.

SIVROPOULOU, A.; KOKKIMI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M.; **Antimicrobial activity of mint essential oils**. Journal Agric Food Chem. v. 43, p. 2384-2388, 1995.

SOARES, Sara Pimenta; VINHOLIS, Adriana Helena Chicharo; CASEMIRO, Luciana Assirati; SILVA, Marcio Luis Andrade; CUNHA, Wilson Roberto; MARTINS, Carlos Henrique Gomes. **Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental**. Revista Odonto Ciência, v.23, n. 2, p. 141-144, 2008

SONCINI; Ricardo A. **Controle de *Salmonella enteritidis* na avicultura**. Embrapa. Disponível em: < [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/anais0204\\_bsa\\_soncini.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais0204_bsa_soncini.pdf)>. Acesso em 13 jun 2014.

SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.S.; POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. **Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil**. Journal of Ethnopharmacology. v.90, n.1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, Patricia Tonion de. **Determinação espectrofotométrica indireta de capsaicinóides em pimentas**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SUDHEESH, Ponnerassery Sukumaran; AL-GHABSHI, Aliya; AL-ABOUDI, Nasser; AL-GHARABI, Sami; AL-KHADHURI, Humaid. **Evaluation of food contact surface contamination and the presence of pathogenic bacteria in seafood retail outlets in the Sultanate of Oman**. Mascate, Sultanato de Omã. Journal of food Science and Technology, v. 5, p. 77-83, 2013.

TEIXEIRA, P.; SILVA, S.; ARAÚJO, F.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. **Bacterial adhesion to food contacting surfaces**. Braga, Portugal. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Ed. A. Méndez-Vilas. IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Biological Engineering, University of Minho, 2007.

TOSCAN, Cristiane Menegotto. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, 2010.

TRINDADE, Manuela P.; FONSECA, Luiza; JUIZ, Paulo José Lima. **Atividade antimicrobiana da tintura de casca de romã (*Punica granatum*) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* estudo *in vitro***. Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde, v. 11, n. 4, p. 49-54, 2009.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H.; CARDOSO, M.G.; ALVES, E. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar**. Rev. bras. plantas med., v.14, n.1, p.57-67 Botucatu, 2012

VIANA, Felipe Cardoso; SANTANA, Ana Carolina Moraes; MOURA, Rute Mendonça Xavier de. **Identificação fitoquímica de flavonoides e taninos em folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) utilizadas tradicionalmente na região sul da Bahia**. Interfaces entre a Pharmacia e as Ciências da Saúde (Revista on-line), v., 2012.

VIEGAS JR, Cláudio, BOLZANI, Vanderlan da Silva, BARREIRO, Eliezer J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Revista Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; REZAEI, M. B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. **Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils**. Phytochemistry, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, jun. 2006.

## ANEXO I: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA DOCE



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL DE ERVA DOCE

Composição Química:

Nome comercial: Erva doce sementes.

Lote: sz33155

Nomenclatura botânica: Pimpinela anisum

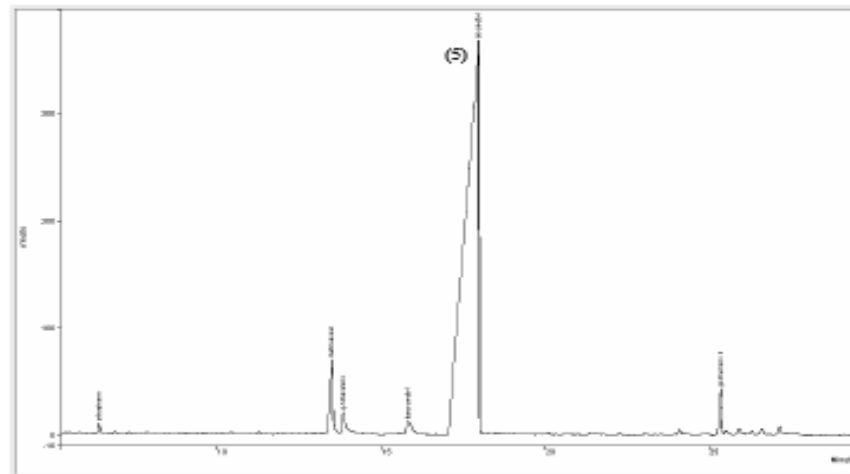
Extração: Destilação por arraste à vapor.

Método de cultivo: convencional

Parte da planta: sementes.

Origem: Hungria.

Pico	Constituinte ID	%
1	$\alpha$ -terpineno	0,3
2	metil cavicol	3,7
3	$\gamma$ -himacaleno	1,3
4	trans-anetol	1,0
5	cis-anetol	90,6
7	germacreno d	2,0



Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Coluna: HP1 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C.

Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FID: 250°C. V. volume de injeção: 1 ul (conc 0,5% em hexano)

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

*Vany Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 28/10/2008

## ANEXO II: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ DO CAMPO



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefax : (31) 3499-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

## ÓLEO ESSENCIAL de HORTELÃ do CAMPO (VICK)

Nome comercial: Hortelã do Campo (Vick) .

Lote:

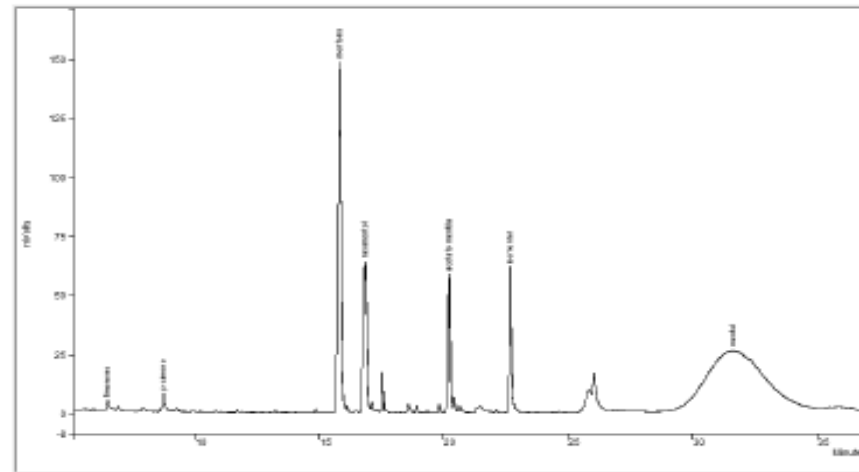
Nomenclatura botânica: *Mentha avensis*.

Extração: Destilação por arraste à vapor.

Método de cultivo:

Parte da planta: Folhas.

Origem: Argentina.



## Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
2	limoneno	0,4
3	1,8-cineol	0,1
4	$\alpha$ -terpineno	0,2
5	p-cimeno	0,8
7	mentona	16,7
8	neomentol	9,3
14	acetato mentila	4,8
17	isomentol	4,9
20	mentol	55,5
21	$\beta$ -cariofileno	0,1

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

*Vany Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 25/09/2008

## Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Coluna: DB-Wax 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C /min, até 150°C. Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FI D: 250°C. Volume de injeção: 1  $\mu$ l (conc 0,5% em hexano)

## ANEXO III: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO GIGANTE

Composição Química:

Nome comercial: Capim Limão Gigante

Lote: capimlim01

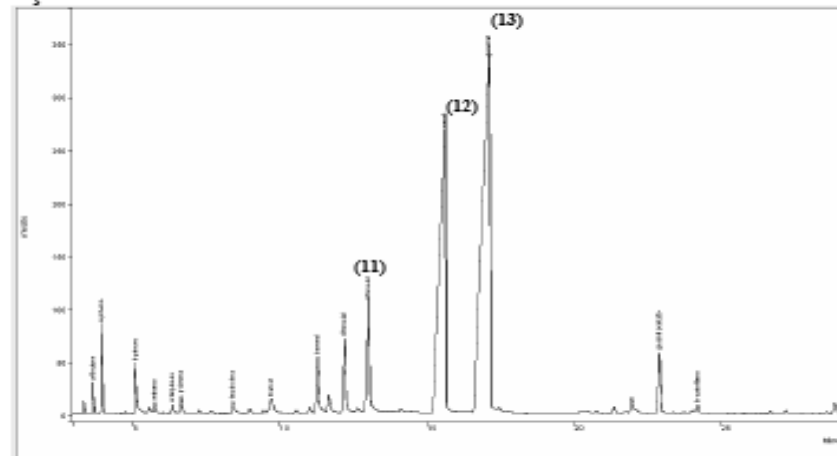
Nomenclatura botânica: Cymbopogon flexuosus

Extração: Destilação por arraste à vapor

Método de cultivo: orgânico sem certificação

Parte da planta: fruta

Origem: Brasil



Pico	Constituinte ID	%
1	$\alpha$ -thujeno	0,6
2	$\alpha$ -pineno	1,9
3	$\beta$ -pineno	1,7
4	mirceno	0,4
5	$\alpha$ -terpineno	0,3
6	p-cimeno	0,6
7	terpinoleno	0,6
8	linalool	1,1
9	borneol	2,4
10	citronelal	3,3
11	citronelol	5,8
12	neral	29,5
13	geranial	46,1
14	geranil acetato	2,3

*Vary Ferraz*

Dra. Vary Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 varyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 18/11/2008

**Método de análise:**

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Coluna: HP1 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C.

Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FID: 250°C. V. volume de injeção: 1  $\mu$ l (conc 0,5% em hexano)

Obs: Picos menores que 0,05% foram excluídos

## ANEXO IV: COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA MALAGUETA

### certificate of analysis

#### Chili CO2-to extract

#### 5 % Capsaicinoids

batch no. 170205, lab no. 4985

Best before: please check delivery note / invoice

#### analytical results:

feature	method	limits	value	unit
Nordihydrocapsaicin	21.030.06, HPLC	n.s.	0,21	%
Nonivamide	21.030.06, HPLC	< 0,26	n.d.	%
Capsaicin	21.030.06, HPLC	n.s.	3,2	%
Dihydrocapsaicin	21.030.06, HPLC	n.s.	1,7	%
Sum of Capsaicinoids	21.030.06, HPLC	4,8 - 5,2	5,1	%
Sum of Carotenoids (calc. as β-Carotene)	21.010.04, 462 nm	n.s.	0,012	%
Colour units	21.055.02, 460 nm	n.s.	209	C.U.
Aflatoxines	external analysis	MHmV	is conform	
Sudan Colours (Sudan I,II,III,IV und Red B)	21.134.01, HPLC; detection limit: 0,1 ppm	< 0,1	n.d.	ppm

n.s. = not specified      n.d. = not detected



## ANEXO V: CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ D'ÁGUA



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Instituto de Ciências Exatas  
 Departamento de Química / Colegiado de Extensão  
 Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

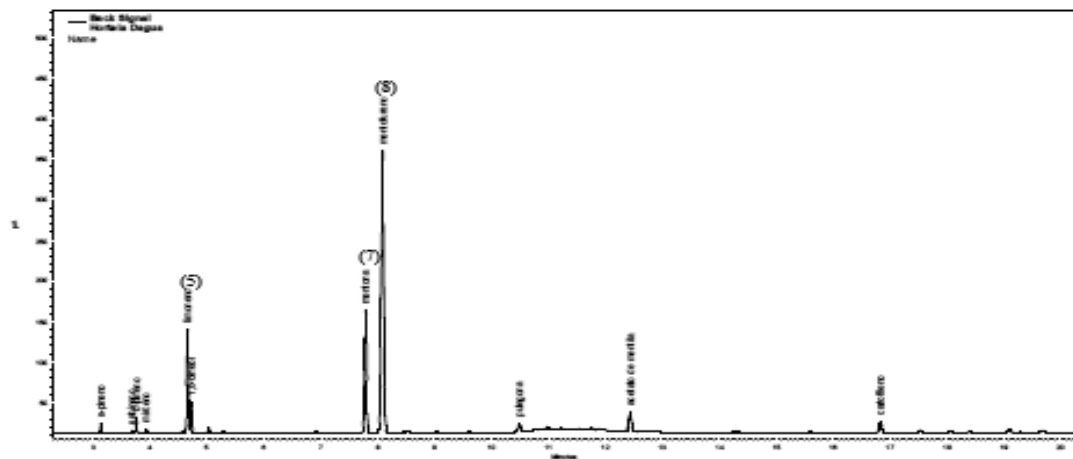
Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

## ÓLEO ESSENCIAL DE HORTELÃ D'ÁGUA

Nome comercial: Óleo de hortelã água  
 Nomenclatura botânica: Mentha aquatica L.  
 Extração: Destilação por arraste a vapor  
 Método de cultivo: Orgânico não certificado  
 Parte da planta: Folhas  
 Origem: Grécia

## Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	$\alpha$ -thujeno	0.8
2	$\alpha$ -pineno	0.3
3	$\beta$ -pineno	1.5
4	mirreno	0.4
5	limoneno	11.1
6	1,8-cineol	3.4
7	mentona	19.2
8	mentofurano	49.9
9	pulegona	1.4
10	acetato de mentila	3.6
11	$\beta$ -cariofileno	2.4



*Vany Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 22/08/2013

## Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A.  
 Coluna: HP-5 30m x 0,32mm x 0,25  $\mu$ m (AGILENT). Temp.: Coluna: 70°C (0min), 3°C/min a 250°C.  
 Injetor: 250°C Split: 1/50. Detector FID: 250°C. Vo l. de injeção: 1  $\mu$ l (conc 1.0 % em clorofórmio)

Obs: Picos menores que 0,2% foram excluídos.

## APÊNDICE I: PLACAS TESTES DE ASSOCIAÇÃO

As áreas sombreadas representam as concentrações onde ocorreu crescimento bacteriano, através da inspeção visual. As áreas em verdes representam as concentrações da associação que apresentou efeito sinérgico.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<u>0000</u> <u>15000</u>	<u>4,88</u> <u>15000</u>	<u>9,76</u> <u>15000</u>	<u>19,53</u> <u>15000</u>	<u>39,06</u> <u>15000</u>	<u>78,12</u> <u>15000</u>	<u>156,2</u> <u>15000</u>	<u>312,5</u> <u>15000</u>	<u>625</u> <u>15000</u>	<u>1250</u> <u>15000</u>	<u>2500</u> <u>15000</u>	<u>5000</u> <u>15000</u>
<b>B</b>	<u>0000</u> <u>7500</u>	<u>4,88</u> <u>7500</u>	<u>9,76</u> <u>7500</u>	<u>19,53</u> <u>7500</u>	<u>39,06</u> <u>7500</u>	<u>78,12</u> <u>7500</u>	<u>156,2</u> <u>7500</u>	<u>312,5</u> <u>7500</u>	<u>625</u> <u>7500</u>	<u>1250</u> <u>7500</u>	<u>2500</u> <u>7500</u>	<u>5000</u> <u>7500</u>
<b>C</b>	<u>0000</u> <u>3750</u>	<u>4,88</u> <u>3750</u>	<u>9,76</u> <u>3750</u>	<u>19,53</u> <u>3750</u>	<u>39,06</u> <u>3750</u>	<u>78,12</u> <u>3750</u>	<u>156,2</u> <u>3750</u>	<u>312,5</u> <u>3750</u>	<u>625</u> <u>3750</u>	<u>1250</u> <u>3750</u>	<u>2500</u> <u>3750</u>	<u>5000</u> <u>3750</u>
<b>D</b>	<u>0000</u> <u>1875</u>	<u>4,88</u> <u>1875</u>	<u>9,76</u> <u>1875</u>	<u>19,53</u> <u>1875</u>	<u>39,06</u> <u>1875</u>	<u>78,12</u> <u>1875</u>	<u>156,2</u> <u>1875</u>	<u>312,5</u> <u>1875</u>	<u>625</u> <u>1875</u>	<u>1250</u> <u>1875</u>	<u>2500</u> <u>1875</u>	<u>5000</u> <u>1875</u>
<b>E</b>	<u>0000</u> <u>937,5</u>	<u>4,88</u> <u>937,5</u>	<u>9,76</u> <u>937,5</u>	<u>19,53</u> <u>937,5</u>	<u>39,06</u> <u>937,5</u>	<u>78,12</u> <u>937,5</u>	<u>156,2</u> <u>937,5</u>	<u>312,5</u> <u>937,5</u>	<u>625</u> <u>937,5</u>	<u>1250</u> <u>937,5</u>	<u>2500</u> <u>937,5</u>	<u>5000</u> <u>937,5</u>
<b>F</b>	<u>0000</u> <u>468,7</u>	<u>4,88</u> <u>468,7</u>	<u>9,76</u> <u>468,7</u>	<u>19,53</u> <u>468,7</u>	<u>39,06</u> <u>468,7</u>	<u>78,12</u> <u>468,7</u>	<u>156,2</u> <u>468,7</u>	<u>312,5</u> <u>468,7</u>	<u>625</u> <u>468,7</u>	<u>1250</u> <u>468,7</u>	<u>2500</u> <u>468,7</u>	<u>5000</u> <u>468,7</u>
<b>G</b>	<u>0000</u> <u>234,3</u>	<u>4,88</u> <u>234,3</u>	<u>9,76</u> <u>234,3</u>	<u>19,53</u> <u>234,3</u>	<u>39,06</u> <u>234,3</u>	<u>78,12</u> <u>234,3</u>	<u>156,2</u> <u>234,3</u>	<u>312,5</u> <u>234,3</u>	<u>625</u> <u>234,3</u>	<u>1250</u> <u>234,3</u>	<u>2500</u> <u>234,3</u>	<u>5000</u> <u>234,3</u>
<b>H</b>	<u>0000</u> <u>0000</u>	<u>4,88</u> <u>0000</u>	<u>9,76</u> <u>0000</u>	<u>19,53</u> <u>0000</u>	<u>39,06</u> <u>0000</u>	<u>78,12</u> <u>0000</u>	<u>156,2</u> <u>0000</u>	<u>312,5</u> <u>0000</u>	<u>625</u> <u>0000</u>	<u>1250</u> <u>0000</u>	<u>2500</u> <u>0000</u>	<u>5000</u> <u>0000</u>

Benzoato de sódio+ Folhas de Pitanga + *S. aureus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	<u>0000</u> <u>15000</u>	<u>4,88</u> <u>15000</u>	<u>9,76</u> <u>15000</u>	<u>19,53</u> <u>15000</u>	<u>39,06</u> <u>15000</u>	<u>78,12</u> <u>15000</u>	<u>156,2</u> <u>15000</u>	<u>312,5</u> <u>15000</u>	<u>625</u> <u>15000</u>	<u>1250</u> <u>15000</u>	<u>2500</u> <u>15000</u>	<u>5000</u> <u>15000</u>
<b>B</b>	<u>0000</u> <u>7500</u>	<u>4,88</u> <u>7500</u>	<u>9,76</u> <u>7500</u>	<u>19,53</u> <u>7500</u>	<u>39,06</u> <u>7500</u>	<u>78,12</u> <u>7500</u>	<u>156,2</u> <u>7500</u>	<u>312,5</u> <u>7500</u>	<u>625</u> <u>7500</u>	<u>1250</u> <u>7500</u>	<u>2500</u> <u>7500</u>	<u>5000</u> <u>7500</u>
<b>C</b>	<u>0000</u> <u>3750</u>	<u>4,88</u> <u>3750</u>	<u>9,76</u> <u>3750</u>	<u>19,53</u> <u>3750</u>	<u>39,06</u> <u>3750</u>	<u>78,12</u> <u>3750</u>	<u>156,2</u> <u>3750</u>	<u>312,5</u> <u>3750</u>	<u>625</u> <u>3750</u>	<u>1250</u> <u>3750</u>	<u>2500</u> <u>3750</u>	<u>5000</u> <u>3750</u>
<b>D</b>	<u>0000</u> <u>1875</u>	<u>4,88</u> <u>1875</u>	<u>9,76</u> <u>1875</u>	<u>19,53</u> <u>1875</u>	<u>39,06</u> <u>1875</u>	<u>78,12</u> <u>1875</u>	<u>156,2</u> <u>1875</u>	<u>312,5</u> <u>1875</u>	<u>625</u> <u>1875</u>	<u>1250</u> <u>1875</u>	<u>2500</u> <u>1875</u>	<u>5000</u> <u>1875</u>
<b>E</b>	<u>0000</u> <u>937,5</u>	<u>4,88</u> <u>937,5</u>	<u>9,76</u> <u>937,5</u>	<u>19,53</u> <u>937,5</u>	<u>39,06</u> <u>937,5</u>	<u>78,12</u> <u>937,5</u>	<u>156,2</u> <u>937,5</u>	<u>312,5</u> <u>937,5</u>	<u>625</u> <u>937,5</u>	<u>1250</u> <u>937,5</u>	<u>2500</u> <u>937,5</u>	<u>5000</u> <u>937,5</u>
<b>F</b>	<u>0000</u> <u>468,7</u>	<u>4,88</u> <u>468,7</u>	<u>9,76</u> <u>468,7</u>	<u>19,53</u> <u>468,7</u>	<u>39,06</u> <u>468,7</u>	<u>78,12</u> <u>468,7</u>	<u>156,2</u> <u>468,7</u>	<u>312,5</u> <u>468,7</u>	<u>625</u> <u>468,7</u>	<u>1250</u> <u>468,7</u>	<u>2500</u> <u>468,7</u>	<u>5000</u> <u>468,7</u>
<b>G</b>	<u>0000</u> <u>234,3</u>	<u>4,88</u> <u>234,3</u>	<u>9,76</u> <u>234,3</u>	<u>19,53</u> <u>234,3</u>	<u>39,06</u> <u>234,3</u>	<u>78,12</u> <u>234,3</u>	<u>156,2</u> <u>234,3</u>	<u>312,5</u> <u>234,3</u>	<u>625</u> <u>234,3</u>	<u>1250</u> <u>234,3</u>	<u>2500</u> <u>234,3</u>	<u>5000</u> <u>234,3</u>
<b>H</b>	<u>0000</u> <u>0000</u>	<u>4,88</u> <u>0000</u>	<u>9,76</u> <u>0000</u>	<u>19,53</u> <u>0000</u>	<u>39,06</u> <u>0000</u>	<u>78,12</u> <u>0000</u>	<u>156,2</u> <u>0000</u>	<u>312,5</u> <u>0000</u>	<u>625</u> <u>0000</u>	<u>1250</u> <u>0000</u>	<u>2500</u> <u>0000</u>	<u>5000</u> <u>0000</u>

Metabissulfito de sódio + Folhas de Pitanga + *S. aureus*

## Continuação APÊNDICE I

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>B</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500
<b>C</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750
<b>D</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875
<b>E</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5
<b>F</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7
<b>G</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3
<b>H</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

Benzoato de sódio + Casca de Romã + *B. cereus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>B</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500
<b>C</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750
<b>D</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875
<b>E</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5
<b>F</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7
<b>G</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3
<b>H</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

Metabissulfito de sódio + Casca de Romã + *B. cereus*

## Continuação APÊNDICE I

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	$\frac{0000}{15000}$	$\frac{4,88}{15000}$	$\frac{9,76}{15000}$	$\frac{19,53}{15000}$	$\frac{39,06}{15000}$	$\frac{78,12}{15000}$	$\frac{156,2}{15000}$	$\frac{312,5}{15000}$	$\frac{625}{15000}$	$\frac{1250}{15000}$	$\frac{2500}{15000}$	$\frac{5000}{15000}$
<b>B</b>	$\frac{0000}{7500}$	$\frac{4,88}{7500}$	$\frac{9,76}{7500}$	$\frac{19,53}{7500}$	$\frac{39,06}{7500}$	$\frac{78,12}{7500}$	$\frac{156,2}{7500}$	$\frac{312,5}{7500}$	$\frac{625}{7500}$	$\frac{1250}{7500}$	$\frac{2500}{7500}$	$\frac{5000}{7500}$
<b>C</b>	$\frac{0000}{3750}$	$\frac{4,88}{3750}$	$\frac{9,76}{3750}$	$\frac{19,53}{3750}$	$\frac{39,06}{3750}$	$\frac{78,12}{3750}$	$\frac{156,2}{3750}$	$\frac{312,5}{3750}$	$\frac{625}{3750}$	$\frac{1250}{3750}$	$\frac{2500}{3750}$	$\frac{5000}{3750}$
<b>D</b>	$\frac{0000}{1875}$	$\frac{4,88}{1875}$	$\frac{9,76}{1875}$	$\frac{19,53}{1875}$	$\frac{39,06}{1875}$	$\frac{78,12}{1875}$	$\frac{156,2}{1875}$	$\frac{312,5}{1875}$	$\frac{625}{1875}$	$\frac{1250}{1875}$	$\frac{2500}{1875}$	$\frac{5000}{1875}$
<b>E</b>	$\frac{0000}{937,5}$	$\frac{4,88}{937,5}$	$\frac{9,76}{937,5}$	$\frac{19,53}{937,5}$	$\frac{39,06}{937,5}$	$\frac{78,12}{937,5}$	$\frac{156,2}{937,5}$	$\frac{312,5}{937,5}$	$\frac{625}{937,5}$	$\frac{1250}{937,5}$	$\frac{2500}{937,5}$	$\frac{5000}{937,5}$
<b>F</b>	$\frac{0000}{468,7}$	$\frac{4,88}{468,7}$	$\frac{9,76}{468,7}$	$\frac{19,53}{468,7}$	$\frac{39,06}{468,7}$	$\frac{78,12}{468,7}$	$\frac{156,2}{468,7}$	$\frac{312,5}{468,7}$	$\frac{625}{468,7}$	$\frac{1250}{468,7}$	$\frac{2500}{468,7}$	$\frac{5000}{468,7}$
<b>G</b>	$\frac{0000}{234,3}$	$\frac{4,88}{234,3}$	$\frac{9,76}{234,3}$	$\frac{19,53}{234,3}$	$\frac{39,06}{234,3}$	$\frac{78,12}{234,3}$	$\frac{156,2}{234,3}$	$\frac{312,5}{234,3}$	$\frac{625}{234,3}$	$\frac{1250}{234,3}$	$\frac{2500}{234,3}$	$\frac{5000}{234,3}$
<b>H</b>	$\frac{0000}{0000}$	$\frac{4,88}{0000}$	$\frac{9,76}{0000}$	$\frac{19,53}{0000}$	$\frac{39,06}{0000}$	$\frac{78,12}{0000}$	$\frac{156,2}{0000}$	$\frac{312,5}{0000}$	$\frac{625}{0000}$	$\frac{1250}{0000}$	$\frac{2500}{0000}$	$\frac{5000}{0000}$

Benzoato de sódio + Casca de Romã + *S. aureus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	$\frac{0000}{15000}$	$\frac{4,88}{15000}$	$\frac{9,76}{15000}$	$\frac{19,53}{15000}$	$\frac{39,06}{15000}$	$\frac{78,12}{15000}$	$\frac{156,2}{15000}$	$\frac{312,5}{15000}$	$\frac{625}{15000}$	$\frac{1250}{15000}$	$\frac{2500}{15000}$	$\frac{5000}{15000}$
<b>B</b>	$\frac{0000}{7500}$	$\frac{4,88}{7500}$	$\frac{9,76}{7500}$	$\frac{19,53}{7500}$	$\frac{39,06}{7500}$	$\frac{78,12}{7500}$	$\frac{156,2}{7500}$	$\frac{312,5}{7500}$	$\frac{625}{7500}$	$\frac{1250}{7500}$	$\frac{2500}{7500}$	$\frac{5000}{7500}$
<b>C</b>	$\frac{0000}{3750}$	$\frac{4,88}{3750}$	$\frac{9,76}{3750}$	$\frac{19,53}{3750}$	$\frac{39,06}{3750}$	$\frac{78,12}{3750}$	$\frac{156,2}{3750}$	$\frac{312,5}{3750}$	$\frac{625}{3750}$	$\frac{1250}{3750}$	$\frac{2500}{3750}$	$\frac{5000}{3750}$
<b>D</b>	$\frac{0000}{1875}$	$\frac{4,88}{1875}$	$\frac{9,76}{1875}$	$\frac{19,53}{1875}$	$\frac{39,06}{1875}$	$\frac{78,12}{1875}$	$\frac{156,2}{1875}$	$\frac{312,5}{1875}$	$\frac{625}{1875}$	$\frac{1250}{1875}$	$\frac{2500}{1875}$	$\frac{5000}{1875}$
<b>E</b>	$\frac{0000}{937,5}$	$\frac{4,88}{937,5}$	$\frac{9,76}{937,5}$	$\frac{19,53}{937,5}$	$\frac{39,06}{937,5}$	$\frac{78,12}{937,5}$	$\frac{156,2}{937,5}$	$\frac{312,5}{937,5}$	$\frac{625}{937,5}$	$\frac{1250}{937,5}$	$\frac{2500}{937,5}$	$\frac{5000}{937,5}$
<b>F</b>	$\frac{0000}{468,7}$	$\frac{4,88}{468,7}$	$\frac{9,76}{468,7}$	$\frac{19,53}{468,7}$	$\frac{39,06}{468,7}$	$\frac{78,12}{468,7}$	$\frac{156,2}{468,7}$	$\frac{312,5}{468,7}$	$\frac{625}{468,7}$	$\frac{1250}{468,7}$	$\frac{2500}{468,7}$	$\frac{5000}{468,7}$
<b>G</b>	$\frac{0000}{234,3}$	$\frac{4,88}{234,3}$	$\frac{9,76}{234,3}$	$\frac{19,53}{234,3}$	$\frac{39,06}{234,3}$	$\frac{78,12}{234,3}$	$\frac{156,2}{234,3}$	$\frac{312,5}{234,3}$	$\frac{625}{234,3}$	$\frac{1250}{234,3}$	$\frac{2500}{234,3}$	$\frac{5000}{234,3}$
<b>H</b>	$\frac{0000}{0000}$	$\frac{4,88}{0000}$	$\frac{9,76}{0000}$	$\frac{19,53}{0000}$	$\frac{39,06}{0000}$	$\frac{78,12}{0000}$	$\frac{156,2}{0000}$	$\frac{312,5}{0000}$	$\frac{625}{0000}$	$\frac{1250}{0000}$	$\frac{2500}{0000}$	$\frac{5000}{0000}$

Metabissulfito de sódio + Casca de Romã + *S. aureus*

## Continuação APÊNDICE I

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>B</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500
<b>C</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750
<b>D</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875
<b>E</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5
<b>F</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7
<b>G</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3
<b>H</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

Benzoato de sódio + Casca de Romã + *S. typhi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000	15000
<b>B</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500	7500
<b>C</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750	3750
<b>D</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875	1875
<b>E</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5	937,5
<b>F</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7	468,7
<b>G</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3	234,3
<b>H</b>	0000	4,88	9,76	19,53	39,06	78,12	156,2	312,5	625	1250	2500	5000
	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000

Metabissulfito de sódio + Casca de Romã + *S. typhi*