



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

ALVARO ITAUNA SCHALCHER PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAIDOS DAS PLANTAS
MEDICINAIS COMUMENTE UTILIZADAS PELA POPULAÇÃO DE
SÃO LUÍS DO MARANHÃO**

São José do Rio Preto
2017

ALVARO ITAUNA SCHALCHER PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAIDOS DAS PLANTAS
MEDICINAIS COMUMENTE UTILIZADAS PELA POPULAÇÃO DE
SÃO LUÍS DO MARANHÃO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejeana Márcia Santos Lima

São José do Rio Preto
2017

Pereira, Alvaro Itauna Schalcher.

Atividade antibacteriana e caracterização físico-química de óleos essenciais extraídos das plantas medicinais comumente utilizadas pela população de São Luís do Maranhão / Alvaro Itauna Schalcher Pereira. -- São José do Rio Preto, 2017

104 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Coorientador: Rejeana Márcia Santos Lima

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Segurança alimentar. 3. Plantas medicinais - São Luís (MA) 4. Essências e óleos essenciais. 5. Extratos vegetais. 6. Antibacterianos. 7. Bactérias – Análise. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 664

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

ALVARO ITAUNA SCHALCHER PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXTRAIDOS DAS PLANTAS
MEDICINAIS COMUMENTE UTILIZADAS PELA POPULAÇÃO DE
SÃO LUÍS DO MARANHÃO**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz
UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Orientador

Prof^a. Dr^a. Vidianny Aparecida Queiroz Santos
UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof^a. Dr^a. Marília Gonçalves Cattelan
UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. Edson José Fragiorge
IFTM - Instituto Federal do Triângulo Mineiro

São José do Rio Preto
28 de abril de 2017

Ao senhor **Deus**, ser supremo e luz do universo, que me ofereceu a vida com alma de criança, e sempre está ao meu lado, me guiando, abençoando e me dando forças inimagináveis para seguir em frente construindo o meu caminho de verdade, além de me oferecer um conjunto maravilhoso de familiares e amigos corretos para dizer sim, e principalmente não, que as vezes dói, mas é necessário.

Em especial à minha adorada e eterna mãe, **Maria Cecília Schalcher Pereira** e minha amada irmã **Amélia da Guia Schalcher Pereira**, (*in memoriam*) a homenagem adequada da mais profunda gratidão por terem sido duas mulheres fortes e determinadas que já conheci, pelo amor incondicional, carinho integral e dedicação absoluta aos ensinamentos de vida. Obrigado, mãe por ter feito e fazer em pensamentos e orações parte de minha vida e ter me dado a graça divina da vida e por ter com sua energia ainda contribuído em realizar mais um sonho neste plano. Sem você irmã, esta realidade imaginária seria mais um sonho, pois meus primeiros passos foram mais fáceis, devido a sua ajuda, sua paciência, sua postura intelectual e seu amor fraterno.

OFEREÇO

Ao meu exemplo de vida integra, honrada, um verdadeiro pai, **Manoel da Guia Pereira**, pelo imenso sentimento de justiça, amor irrestrito a família, confiança na palavra de cada filho, apoio aos meus sonhos por absurdos que fossem...

À minha filha, **Nayka Lídia de Oliveira Schalcher Pereira**, minha eterna criança, meu amor pulsante, dentro do meu coração o qual faz meus sentimentos de pai adquirem multiplicidade todos os instantes da minha vida.

A minha namorada **Adriana da Conceição Pinheiro Vieira** minha esperança de ser um homem realizado e feliz, minha eterna amada, companheira exemplar e mulher admirável.

Aos meus adorados irmãos **Amélia Cecilia Schalcher Pereira**, **Aldemir da Guia Schalcher Pereira** e **Alvimar de Jesus Schalcher Pereira**, que sempre me ajudam em toda circunstância.

Ao meu amigo admirável, dedicado, futuro mestre e aluno exemplar **Oswaldo Palma Lopes Sobrinho** por me fazer acreditar cada vez mais no Ensino.

Aos meus queridos sobrinhos **Adilson Luís Pereira Silva**, **Anderson Luís Pereira Silva**, **Luís Eduardo Schalcher Pereira**, **Karoline de Jesus Schalcher Pereira Galiza**, **Felipe Brandão Bessa Schalcher**, **André Victor Macedo Pereira** e

Giovana Alecssandra Castro Moreira Pereira, que são de coração meus filhos e filhas também....

Aos meus amigos mais próximos que estão sempre dispostos a me apoiar **Erika de Kassia Pereira Cantanhede, Gilvan Pereira de Figueiredo, Inaldo Alves Pereira dos Santos, Jorge Evandro Passos da Silva, Paulo Chaves Jansen e José de Ribamar Pereira Alves** que repartem minhas alegrias e me ajudam a enfrentar as tristezas, para tornar-me merecedor dessas amizades tão extraordinárias para mim.

Aos meus amigos que torcem pela minha caminhada nesta estrada chamada vida, **Antonio Pereira da Silva Lobão Filho, Arivaldo Costa da Silva, Bergman de Moura Figueredo, Cesário Jorge Fahd Júnior, Edinaldo Araujo Carneiro, George Rabelo Guimarães, Joel Rogério de Castro Pires, Marcio Alex Berrêdo Brasil, Rafael da Silva Serra, Raimundo Wilson de Paiva Coimbra.**

Aos meus amigos voluntários do Programa Gespública/MA, **Leidismar Fernandes Nalasco, Luiz Gustavo Araújo e Rosa Graça Lima Barreto Domingues.** E também a **Amélia Santos Pinheiro Gomes** filha do saudoso poeta Bandeira Tribuzi ...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao todo poderoso **Deus**, que nos dá o dom da vida e concebe maravilhas inexplicáveis.

Aos meus pais, que um dia sonharam comigo e me deram a vida, agradeço de coração por ter me ensinado que vale a pena acreditar e lutar pelos nossos sonhos com respeito, determinação, resiliência e com o principal sentimento o Amor.

Ao **Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz**, pela orientação deste trabalho, pela amizade, paciência, compreensão, confiança e ensinamentos compartilhados durante estes já alguns anos de convívio sempre com seu bom humor e uma lição de vida em cada encontro.

À **Profª. Drª. Rejeana Márcia Santos Lima**, pela amizade, apoio, co-orientação e colaboração prestada na realização deste trabalho.

Aos docentes **Profª. Drª. Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes** e **Prof. Dr. Mauricio Boscolo** pelo carinho por suas contribuições na banca de qualificação.

Aos professores da UFMA que contribuíram para a efetiva concretização desse passo importante na minha carreira acadêmica, especialmente aos Professores Doutores **Victor Elias Mouchrek Filho** e **Adenilde Ribeiro Nascimento**.

Aos colegas do DINTER que ajudaram na caminhada até aqui de forma bastante diferenciada, pois foram excelentes nas atitudes e nos conselhos futuros doutores **Adeval Alexandre Cavalcante Neto, Flávia de Aquino Cutrim, Franky Soedirlan Resosemito, Francisco José da Conceição Lima, Jackellyne Georgia Dutra e Silva Leite, José Manoel de Moura Filho, Liane Carolina Souza Nascimento, Luzilene Souza Rosas, Luzimary de Jesus T. G. Rocha, Marcelo Vieira de Oliveira, Maron Stanley Silva Oliveira Gomes, Ocilene Maria. C. Ferreira, Pedro A. Pavão Pessoa, Raquel Torquato Fernandes e Valdênia Cristina Mendes Mendonça**.

Todos os professores da Engenharia de Alimentos **Dra. Ana Carolina Conti e Silva, Dra. Ana Lúcia Barretto Penna, Dra. Andrea Carla da Silva Barretto, Dra. Célia Maria Landi Franco, Dra. Ellen Silva Lago Vanzela, Dr. Javier Telis Romero, Dr. João Cláudio Thomé, Dr. José Antônio Gomes Vieira, Dra. Maria**

Aparecida Mauro, Dra. Natália Soares Janzantti, Dra. Neuza Jorge, Dr. Róger Darros Barbosa, Dr. Silvio José Ferreira de Souza, Dra. Vânia Regina Nicoletti Telis e em especial aos professores ***Dr. José Francisco Lopes Filho e Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi.***

Todos os companheiros de Laboratório do DETA aos técnicos com alma de artista o poeta ***Ginaldo Vieira dos Santos*** e o pintor ***Luiz Carlos Camolezi***, e em especial a ***Tânia Maria Vinturim Gonçalves***, assistente de suporte acadêmico II pelo apoio nas práticas de microbiologia ensinando muitas vezes o “pulo do gato”. A ***Denise Arrais da Silva Costa*** pelo auxílio a mim prestado. E também, a ***Natália Cristina Antunes Gabriel*** do setor de zeladoria. E demais funcionários e servidores que por algum lapso tenha esquecido que ajudaram direta ou indiretamente nas práticas laboratoriais.

Aos Grupos de Pesquisa do IFMA: Química, Meio Ambiente e Ensino de Ciências (QMAEC); Núcleo Autônomo de Ações Sustentáveis em Química Analítica, Alimentos e Água (NASQA) e Ações em Recursos Agroambientais (GARSA) e da UNESP: Biopolímeros e Subprodutos Microbianos (BSM).

Aos meus colegas professores do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – Campus Codó, e em especial meus alunos que acompanharam toda esta trajetória de dedicação e esforço ***Francilene Mamedio dos Santos, Francineide da Cruz Nascimento, Isaque Pinho dos Santos, Lana Fernanda Borges da Silva, Leonardo Ewerton, Luís Fernandes de Sousa Filho, Maria de Assunção Silva Carlos, Mayane Maria Francelino de Almeida, Nathalia de Moraes Sousa, Paula Maria de Almeida Santos não esquecendo à ilustre Baiana Thaine Teixeira.***

Aos administrativos que conseguem realizar suas atividades com bastante dedicação e empenho da seção da pós-graduação.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que agora, por total incompetência de minha memória, deixei de mencionar.

A todos, meu carinho, respeito e gratidão...

"As plantas medicinais brasileiras não curam apenas, fazem milagres".

(Carl Friedrich Philipp von Martius)

RESUMO

Os óleos essenciais obtidos de plantas medicinais vêm sendo ressaltados ao longo das décadas e sua eficácia tem sido evidenciada por pesquisadores de todo mundo, devido ao seu efeito antibacteriano. Objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos por hidrodestilação e determinar a composição química por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) de cinco plantas medicinais dentre elas alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), eucalipto (*Eucalyptus citriodora* H.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.), selecionadas em mercados e/ou feiras livres de São Luís – MA. Para tanto, os testes microbiológicos foram utilizados seis cepas bacterianas da American (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) Gram-positivas além de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) Gram-negativas e comparados com antimicrobiano padrão. As Concentrações Mínimas Inibidoras (MIC) utilizadas foram 25, 50, 75 e 100µg/mL. Os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* com os halos de inibição das espécies bacterianas selecionadas, foram analisadas sobre teste de ANOVA, utilizando-se o Delineamento em Blocos ao Acaso, contendo cinco tratamentos, em dois blocos sendo possível constatar a não existência de diferença estatística em variáveis ($p \leq 0,05$). Para o óleo essencial do capim-limão, em especial para *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* com concentração de 75µg/mL. O óleo essencial do cravo-da-índia, atingiu um resultado frente à bactéria *Staphylococcus aureus* com uma concentração de 25µg/mL e as demais bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis com 50µg/mL, sendo *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 100µg/mL. O óleo essencial de Eucalipto conseguiu obter um resultado parcialmente ativo para as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis com concentração a partir de 50µg/mL e ativo para uma concentração de 75µg/mL para a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Por fim, o óleo essencial do manjerição na concentração de 25µg/mL sendo ativo perante a bactéria *Staphylococcus aureus*, aumentou-se a concentração para 50mg/mL na Gram-

positiva *Bacillus cereus* e nas duas Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis, ambas sofreram a ação bactericida do óleo essencial. A bactéria *Enterococcus faecalis* apesar de ter sido classificada pelo halo de inibição ativa precisou de concentração mínima do estudo. Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia de gases e espectrometria de massas – CG/EM e determinados os parâmetros físico-químicos: densidade, índice de refração, solubilidade em álcool (70%), odor, cor, aparência. Posteriormente, os picos cromatográficos (*fingerprints*) dos componentes minoritários e majoritários presentes nas diferentes frações dos cinco óleos essenciais foram identificados e quantificados. Para tanto, os compostos identificados pela análise química de CG/EM constataram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonados (não oxigenados) e oxigenados, além de três fenilpropanoides com diversidade de estruturas químicas de baixo peso molecular. Assim sendo, estudos futuros, visando à aplicabilidade destes óleos como aditivos naturais, devem ser realizados na tentativa de aumentar a vida de prateleira de alimentos, bem como melhorar as características físico-químicas e alcançar a segurança alimentar desejada.

Palavras-chave: Bactérias. CGEM. Disco-difusão. Efeito antibacteriano. MIC.

ABSTRACT

Essential oils obtained from medicinal plants have been highlighted over the decades and their efficacy has been evidenced by researchers around the world due to their antibacterial effect. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of essential oils extracted by hydrodistillation and to determine the chemical composition by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) of five medicinal plants such as rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), clove (*Caryophyllus aromaticus* L.), eucalyptus (*Eucalyptus citriodora* H.) and basil (*Ocimum basilicum* L.), Selected in markets and/or free fairs of São Luís - MA. For this purpose, six bacterial strains of Gram-positive American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) were used in addition to *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis* (ATCC 12011) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) Gram-negative and compared with standard antimicrobial. The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) used were 25, 50, 75 and 100µg/mL. The results of the in vitro antibacterial activity with the inhibition halos of the selected bacterial species were analyzed on the ANOVA test, using the randomized block design, containing five treatments, in two blocks and it was possible to verify the existence of statistical difference in variables ($p \leq 0,05$). For lemongrass essential oil, especially for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* with a concentration of 75µg/mL. The essential oil of the clove reached a result against *Staphylococcus aureus* with a concentration of 25µg/mL and the other bacteria *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis* with 50µg/mL, being *Pseudomonas aeruginosa* at the concentration of 100µg/mL. Finally, the essential oil of basil at a concentration of 25µg/mL being active against the bacterium *Staphylococcus aureus*, the concentration was increased to 50mg / mL in Gram-positive *Bacillus cereus* and in the two Gram-negative *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype *Choleraesuis*, Both underwent the bactericidal action of the essential oil. The bacterium *Enterococcus faecalis*, despite being classified by the active inhibition halo, required a minimum concentration of the study. The essential oils were analyzed by gas chromatography and GC/MS mass spectrometry and the

physicochemical parameters were determined: density, refractive index, alcohol solubility (70%), odor, color, appearance. Subsequently, the fingerprints of the minority and major components present in the different fractions of the five essential oils were identified and quantified. For this, the compounds identified by the GC/MS chemical analysis showed the presence of monoterpenes and hydrocarbon (non-oxygenated) and oxygenated sesquiterpenes, in addition to three phenylpropanoids with a diversity of low molecular weight chemical structures. Therefore, future studies aiming at the applicability of these oils as natural additives should be carried out in an attempt to increase the shelf life of foods, as well as to improve the physico-chemical characteristics and achieve the desired food safety.

Keyword: Bacteria. CGEM. Disc-diffusion. Antibacterial effect. MIC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Área de estudo da cidade de São Luís – MA	24
Figura 2	– Rota metabólica dos metabólitos secundários	28
Figura 3	– Estrutura química do isopreno	29
Figura 4	– Mapa do município de São Luís – MA	35
Figura 5	– Aparelho Clevenger modificado	37
Figura 6	– Procedimentos básicos na inoculação das placas	39
Figura 7	– Fluxograma do material botânico (folhas) a identificação por CG/EM	45
Figura 8	– Cromatograma do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	69
Figura 9	– Estruturas dos compostos marcadores detectados no óleo essencial de OEA	70
Figura 10	– Cromatograma do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (D. C.) <i>Stapf.</i>	71
Figura 11	– Estruturas dos principais compostos marcadores detectados do OECL	72
Figura 12	– Cromatograma do óleo essencial de (<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.) ..	73
Figura 13	– Estruturas dos principais compostos marcadores detectados do OECL	74
Figura 14	– Estrutura do principal composto marcador detectado do OEE	75
Figura 15	– Cromatograma do óleo essencial de <i>Eucalyptus citriodora</i> Hook	75
Figura 16	– Cromatograma do óleo essencial de (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	77
Figura 17	– Estruturas dos principais compostos marcadores detectados do OEM	77
Gráfico 1	– Mercado Global de óleo essencial (2014-2020)	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Principais grupos de metabólitos secundários	30
Tabela 2	– Critérios da aceitação da atividade antimicrobiana	38
Tabela 3	– Critérios da atividade antibacteriana pelo tamanho do halo de Inibição	41
Tabela 4	– Tabela da Análise de Variância (ANOVA)	47
Tabela 5	– Atividade antibacteriana do óleo essencial do alecrim	49
Tabela 6	– Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do alecrim ...	50
Tabela 7	– Atividade antibacteriana do óleo essencial do capim-limão	50
Tabela 8	– Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do capim- limão	51
Tabela 9	– Atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia	52
Tabela 10	– Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do cravo-da- índia	53
Tabela 11	– Atividade antibacteriana do óleo essencial do eucalipto	54
Tabela 12	– Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do eucalipto	54
Tabela 13	– Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço	55
Tabela 14	– Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do manjeriço	56
Tabela 15	– MIC do extrato de óleo essencial de alecrim	56
Tabela 16	– MIC do extrato de óleo essencial do capim-limão	57
Tabela 17	– MIC do óleo essencial do cravo-da-índia	58
Tabela 18	– MIC do óleo essencial do eucalipto	59
Tabela 19	– MIC do óleo essencial do manjeriço	60
Tabela 20	– Médias dos diâmetros dos halos de inibição	61
Tabela 21	– Compostos identificados e quantificados por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas - CG/EM	65
Tabela 22	– Composição relativa dos constituintes dos óleos essenciais selecionados	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHI	Brain and Heart Infusion
CEASA	Centrais Estaduais de Abastecimento
CFO	Cefalotina
CG	Cromatógrafo gasoso
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COBAL	Companhia Brasileira de Alimentos
CTX	Cefotaxina
DETA	Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos
DSS	Distritos Sanitários de Saúde
DTA	Doença Transmitida por Alimento
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ERI	Eritromicina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GEN	Gentamicina
GRAS	<i>Usually Recognized as Safe</i>
IAL	Instituto Adolf Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro Geográfico e Estatístico
IFMA	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão
IK	Índice de Kovats
ISSO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

MHA	Ágar Müller-Hinton
PEN	Penicilina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. entérica</i>	<i>Salmonella enterica</i> sorotipo Choleraesuis
SEMAPA	Secretaria de Agricultura, Pesca e Abastecimento
SEMUS	Secretaria Municipal de Saúde de São Luís
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TET	Tetraciclina
UV	Ultra-violeta
VAN	Vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
hab/km²	Habitante por quilometro quadrado
h	Hora
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milímetro
mol/L	Mol por litro
ppm	Parte por milhão
%	Porcentagem
kPa	Quilo pascal
km²	Quilometro quadrado
µg/mL	Relação micrograma por mililitro
°C	Temperatura na escala graus Celsius
UFC/mL	Unidade formadoras de colônias por mililitro
USD	United States Dollar
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Geral	23
2.2	Específicos	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	A ilha de São Luís	24
3.2	Plantas Medicinais	25
3.3	Metabolismo primário e secundário	28
3.4	Óleos Essenciais	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Caracterizações geográficas das áreas de estudo	35
4.2	Seleção das plantas medicinais	36
4.3	Obtenção dos óleos essenciais	36
4.4	Atividade antibacteriana	38
4.4.1	Microrganismos	38
4.4.2	Meios de cultivo e preparação do inóculo	39
4.4.3	Atividade antibacteriana por disco-difusão	40
4.4.4	Determinação da MIC por disco-difusão	40
4.4.4.1	Preparo das soluções de óleos essenciais	41
4.4.4.2	Inoculação das placas	41
4.4.5	Antimicrobianos padrão	42
4.5	Características físico-químicas dos óleos essenciais	42
4.5.1	Densidade	43
4.5.2	Índice de refração	43
4.5.3	Solubilidade em etanol (70%)	43
4.5.4	Cor e Aparência	43
4.5.5	Odor	44
4.6	Perfil cromatográfico dos óleos essenciais	44
4.7	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	Atividade Antibacteriana dos óleos essenciais	49

5.1.1	Estudo do óleo essencial bruto do alecrim	49
5.1.2	Estudo do óleo essencial bruto do capim limão	50
5.1.3	Estudo analítico do óleo essencial bruto do cravo-da-índia	52
5.1.4	Estudo analítico do óleo essencial bruto do eucalipto	53
5.1.5	Estudo analítico do óleo essencial bruto do manjeriço	55
5.2	Interferência dos de óleos essenciais sobre as bactérias	
	Patogênicas	60
5.2.1	Estudo estatístico dos óleos frente à bactéria <i>S.aureus</i> (ATCC 25923) ...	61
5.2.2	Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria <i>B. cereus</i> (ATCC 10876)	62
5.2.3	Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	62
5.2.4	Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria a bactéria <i>E. coli</i> (ATCC 25922)	63
5.2.5	Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011)	63
5.2.6	Estudo estatístico dos óleos frente à bactéria <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	63
5.3	Análise química dos óleos essenciais por CG/EM	64
5.3.1	Análise química do óleo essencial de alecrim por CG/EM	68
5.3.2	Análise química do óleo essencial de capim-limão por CG/EM	71
5.3.3	Análise química do óleo essencial de cravo-da-índia	73
5.3.4	Análise química do óleo essencial de Eucalipto	75
5.3.5	Análise química do óleo essencial de manjeriço por CG/EM	76
6	CONCLUSÕES	79
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	96
	APÊNDICE A – Fórmulas dos Cálculos estatísticos da ANOVA	97
	APÊNDICE B – Demais fórmulas estatísticas utilizadas nesta pesquisa	98
	APÊNDICE C – Demais fórmulas estatísticas utilizadas nesta pesquisa Cálculos estatísticos aplicados na ANOVA	99
	APÊNDICE D – Continuação dos cálculos estatísticos – ANOVA	100

ANEXOS	101
ANEXO A – Antibióticos comerciais da série Gram-positiva	102
ANEXO B – Antibióticos comerciais da série Gram-negativa	103
ANEXO C – Distribuição Teste F (Fisher-Snedecor) 5% de probabilidade	104

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Entre as virtudes terapêuticas, as plantas medicinais constituem uma das grandes soluções para a humanidade, que afeta boa parte das comunidades carentes e/ou receosas com medicamentos vendidos em farmácias em todo mundo, sendo o principal fator de uso das propriedades medicamentosas que afirmam serem naturais e salutaras. Os conhecimentos pré-estabelecidos de óleos essenciais já existem em diversos estudos que comprovam sua ação antibacteriana, sendo estas fontes medicamentosas provenientes da natureza são relatadas na literatura científica.

Os agentes antibacterianos naturais ganham destaque pelo seu uso estar associado à tecnologia emergente para a conservação de alimentos, de grande importância mundial, devido à sua possível utilização na indústria alimentícia e também como fonte valiosa na medicina tradicional. Em contrapartida, a viabilidade do uso dos óleos essenciais de plantas medicinais, ainda é baixa, por apresentarem pouca disponibilidade de cultivares comerciais, substituídas por seus derivados sintéticos vendidos em farmácias.

Em alguns bairros as feiras e/ou mercados de São Luís – MA são consideradas pontos tradicionais de comércio para compras e vendas de plantas medicinais. O Mercado Central é o principal ponto de compras e vendas de diversos produtos como frutas, legumes, pescados, carnes, roupas, cosméticos entre outros, além de bancas que são específicas na comercialização de plantas medicinais, pelos chamados raizeiros que são fontes de informações e/ou conhecimentos sobre as plantas medicinais.

Sabe-se que os óleos essenciais são formados por constituintes químicos voláteis, que possivelmente estão presentes em várias partes das plantas medicinais, tais como: flores, frutos, raízes, rizomas e, em especial nas folhas. Esses compostos apresentam características odoríferas específicas, de caráter lipofílico e, no processo de obtenção dos óleos essenciais por hidrodestilação, separam-se da água por diferenças de densidade e polaridade.

A determinação da ação destes óleos essenciais sobre os microrganismos, especificamente no universo bacteriano, utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas deve ser realizada, devido seu baixo custo de aquisição, uso e ação terapêutica, como a viabilidade do potencial medicinal e seu possível emprego na

indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, baseado na presença de constituintes químicos que garantem a sua ação antimicrobiana, especificamente antibacteriana.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais extraídos por hidrodestilação e determinar a composição química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG/EM de cinco plantas medicinais alecrim, capim-limão, cravo-da-índia, eucalipto e manjeriço.

2.2 Específicos

- a) Extrair os óleos essenciais pelo processo de hidrodestilação de plantas medicinais selecionadas;
- b) Avaliar o efeito da atividade antibacteriana dos óleos essenciais testados;
- c) Testar a atividade antibacteriana *in vitro* e a MIC de óleos essenciais das plantas medicinais;
- d) Comparar de óleos essenciais com antimicrobiano padrão;
- e) Determinar os parâmetros físico-químicos de óleos essenciais selecionados;
- f) Identificar e quantificar a composição química de óleos essenciais para as amostras obtidas no mesmo tempo de extração por CG/EM.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A ilha de São Luís

Na realização desta pesquisa foi elaborado um estudo sobre o município de São Luís, entre 29 feiras e/ou mercados com cerca de 9 mil feirantes, incluídos neste contexto, 10 estabelecimentos administrados pela Secretaria de Agricultura, Pesca e Abastecimento (SEMAPA), e 19 centros de comercialização em parceria com a Prefeitura Municipal de São Luís e outros espaços de propriedade do Estado do Maranhão, pertencentes a particulares, garantindo assim o comércio informal, tais como algumas associações destas feiras e/ou mercados e, empresas ligadas ao ramo alimentício - atacadista frutihortigrangeiro.

De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017) a cidade São Luís, é capital do Estado do Maranhão, com área territorial equivalente a 827.141 km², possuindo cerca de 1.526.213 habitantes, apresenta uma densidade demográfica equivalente a 1.286,6 hab./km², bem mais significativa e expressiva que a densidade demográfica do Estado: 20,81 hab./km² (Figura 1).

Figura 1 – Área de estudo da cidade de São Luís – MA.



Fonte: Estados e Capitais do Brasil (2016).

Relevante, nesse plano, as feiras e/ou mercados são compreendidos de fato em espaços preferencialmente diversificados, cujos escambos de saberes populares e vivências são constitutivos da identidade ludovicense, seguindo assim esta regra do uso, nas últimas décadas tem ocorrido crescente interesse pelo conhecimento, utilização e comercialização de plantas medicinais e produtos fitoterápicos no Brasil e no mundo, o que tem proporcionado uma grande expansão desse mercado (FREITAS et al., 2012).

As feiras e/ou mercados são um campo inexaurível, em particular na utilização das indicações terapêuticas dos raizeiros, as quais podem sofrer alterações conforme as localidades visitadas e estudadas, em relação aos mais variados tipos de plantas medicinais e seus derivados, a fim de que, verificando-se a qualidade desses produtos, ganhem cada vez mais confiança com relação à segurança alimentar. Comumente, os usuários não costumam declarar aos profissionais de saúde que fazem uso das plantas medicinais, a menos que haja alguma sinalização, por parte destes, da aceitação desta prática (PALMA, 2011).

Dado o seu caráter polarizador, as feiras livres concentram importantes informações de cunho etnobotânico, disponibilizando a população insumos requeridos nas práticas terapêuticas tradicionais (ROCHA et al., 2012).

3.2 Plantas Medicinais

Desde o início da sua existência, o homem viu nas plantas medicinais o seu meio de sobrevivência, tanto na obtenção de alimento e vestuário quanto na sua defesa e cura de enfermidades (CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012).

Deve-se supor que as plantas medicinais são aquelas que contêm substâncias bioativas com propriedades terapêuticas, profiláticas ou paliativas utilizadas na medicina. Atrelado a este fato, ao longo do tempo, populações cuja sobrevivência dependia diretamente dos ambientes naturais desenvolveram eficientes práticas terapêuticas através do uso de plantas medicinais com base na observação e experimentação (ALBUQUERQUE et al., 2012).

De acordo com Firmo (2011), uma planta é considerada medicinal quando a mesma é administrada pelo homem ou animal em qualquer via ou forma que exerça ação terapêutica. Logo, o seu tratamento é feito com uso de plantas medicinais

sendo denominado de fitoterapia, e os fitoterápicos são os medicamentos produzidos a partir dessas plantas.

Inicialmente, estes medicamentos à base de plantas eram utilizados na forma de infusão (chá), pó ou decocto, ou ainda, através da via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo para unguentos e cataplasmas (VIEIRA et al., 2010). Baseado nesta hipótese, o caso de espécies medicinais, sintetizam óleos essenciais; os nutrientes podem aumentar a produção e melhorar a qualidade de óleo (CORRÊA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014; EL GENDY et al., 2015).

Sabe-se que a utilização disseminada de antibióticos na medicina humana, na veterinária e em atividades agrícolas tem sido responsabilizada pela propagação dos mecanismos de resistência a antibióticos apresentados pelos microrganismos, sendo assim, associada ainda à redução nas opções de tratamento e queda na eficácia terapêutica em pacientes humanos (DIARRA; MALOUIN, 2014).

Do ponto de vista terapêutico, as plantas medicinais provavelmente têm um comportamento característico, devido ao seu metabolismo secundário e suas substâncias biologicamente ativas, sem provocar efeitos colaterais nocivos ao homem. Isso significa que até o século XX, toda história de cura encontrava-se ligada às plantas medicinais e aos recursos minerais (ALMEIDA, 2011).

No Brasil, os dois principais fatores que influenciam na manutenção da utilização de plantas medicinais são eles baixo nível de vida da população e o alto custo dos medicamentos (ARGENTA, 2011). Nesta perspectiva o Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento terapêutica, pelo fato de apresentar a maior diversidade vegetal do mundo, além de ampla sociodiversidade no uso de plantas medicinais, vinculado ao conhecimento tradicional e possuir tecnologia para validar cientificamente este conhecimento (SECRETARIA DE SAÚDE, 2014).

Nem sempre os princípios ativos de uma planta medicinal são experimentados, mas, mesmo assim, ela pode apresentar atividade medicinal satisfatória e ser utilizada desde que não apresente consequência tóxica direta ou indireta. No entanto, essas práticas relacionadas ao uso popular de plantas medicinais são o que muitas comunidades têm como alternativa viável para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde (AMOROZO, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) pelo menos 80% das pessoas que vivem em países emergentes depende de plantas medicinais para cuidados básicos da saúde pública (BOUKHATEM et al., 2013). Em face disso,

quando as plantas medicinais e aromáticas sofrem estresse hídrico, tanto a produção quanto a composição dos princípios ativos podem ser alteradas (BETTAIEB et al., 2009).

Cerca de 90% da população mundial utiliza medicamentos fitoterápicos desde meados de década de 80, estudiosos brasileiros tentam quantificar o uso de plantas medicinais pela população, tendo como principal alvo de estudo, às mulheres grávidas e mães de crianças com até cinco anos de idade, levando em consideração que a cultura do uso de terapias naturais é passada de geração a geração (FERREIRA et al., 2014).

O horário em que uma planta medicinal deve ser colhida é um fator importante no rendimento do óleo essencial, pois durante o dia ocorrem variações de temperatura, luminosidade, radiação fotossinteticamente ativa e umidade relativa do ar. Estes fatores encontram-se relacionados à biossíntese de metabólitos primários e secundários nas plantas medicinais (JOSÉ et al., 2015). Pode ser alterado devido a outros fatores tais como a fase do ciclo de vida da espécie, métodos de colheita, extração e condições ambientais (SOUSA, 2011).

As plantas medicinais representam fonte de compostos bioativos sendo promissoras para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, com grande potencial na geração de novos produtos de interesse da sociedade (ATANASOV et al., 2015; ZANDI-SOHANI; RAMEZANI, 2015). Diante disso, reforça-se a necessidade da utilização e efeito das plantas medicinais na saúde humana é sobejamente conhecido devido essencialmente à presença de vários compostos químicos entre os quais, terpenóides, alcalóides, fenóis, glicosídeos e taninos (EGWAIKHIDE et al., 2009; KOLASANI et al., 2011).

Para ter segurança e eficácia na utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos, devem-se consultar a literatura científica existente sobre suas propriedades farmacológicas e toxicidade (STERN, 2013). Consoante a este fato, a grande quantidade de plantas medicinais em que se pode extrair e a numerosa quantidade de constituintes químicos presentes nos óleos essenciais, é, portanto, uma fonte de substâncias bioativas (ALI, 2012).

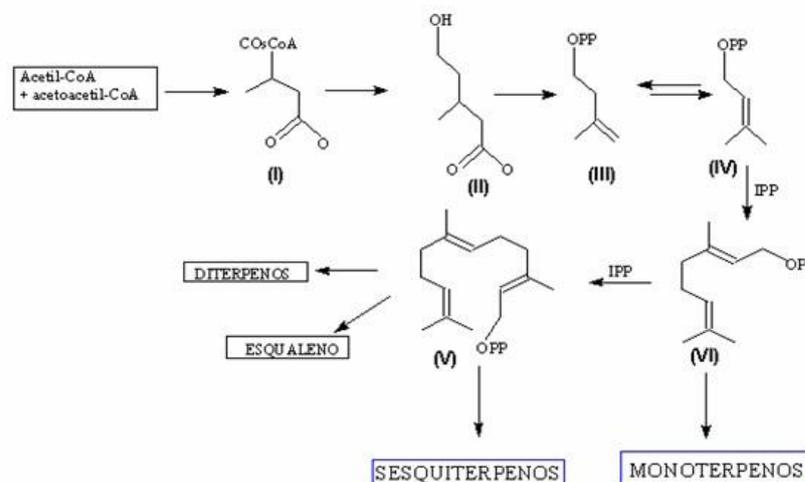
3.3 Metabolismo primário e secundário

Pereira e Cardoso (2012) relataram que o metabolismo sendo um conjunto total de reações químicas (anabólicas, catabólicas ou de biotransformação) ocorre continuamente em cada célula, isto é, há transformação de compostos orgânicos catalisados por enzimas que direcionam essas reações para produção de energia nas células vivas para manutenção diária.

Todas as plantas medicinais produzem compostos bioativos através do seu metabolismo que são imprescindíveis para garantir a sobrevivência, podendo estas ser distinguidas em metabolitos primários (comuns a todos os seres vivos) nomeadamente, lipídeos, hidratos de carbono e proteínas; e metabolitos secundários (específicos de cada organismo e derivados dos primários), terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados que são derivados de diversas vias metabólicas (ENGELBERTH, 2010; SOUZA et al., 2010).

Observa-se na Figura 2 que a rota metabólica dos metabolitos secundários derivados do isopreno segue (I) 3-hidróxi-3-metil-glutaril-CoA; (II) mevalonato; (III) isopentenil-pirofosfato (IPP); (IV) dimetilalila-pirofosfato; (V) geranyl-pirofosfato e (VI) famesila-pirofosfato, assim, uma unidade de acetoacetyl-CoA sofre o processo de condensação com uma molécula da acetil-CoA e, após o processo de hidrólise, forma a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (I). Por uma reação irreversível, (I) é reduzida a mevalonato (II), então convertido em isopentenil-pirofosfato (III), ou isopreno ativo, a unidade básica da formação dos terpenos (NAVARRETE et al., 2011).

Figura 2 - Rota metabólica dos metabolitos secundários.



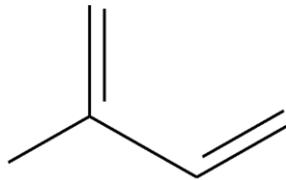
Fonte: Navarrete et al., (2011).

O metabolismo secundário origina metabólitos encontrados em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas e embora não sejam essenciais para que a planta medicinal complete seu ciclo de vida, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie (SIMÕES et al., 2004; ZANDI-SOHANI; RAMEZANI, 2015).

A relevância em desenvolver métodos de extração de princípios ativos de novas substâncias vegetais e com o objetivo de inibir e combater patógenos que constantemente adquirem resistência aos antibióticos hoje disponíveis para uso (MENDES et al., 2011; GONÇALVES et al., 2011; BERNARDI et al., 2012; ELLER et al., 2015).

Dos princípios ativos encontrados nas plantas medicinais, responsáveis pelos efeitos terapêuticos destacam-se os terpenos que são formados pela unidade básica denominada de isopreno (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química do isopreno.



Fonte: Costa (2015).

A Figura 3 ilustra que o isopreno, conhecido por 2-metil-1,3-butadieno pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) pode apresentar grupos químicos, tais como: ácidos orgânicos, alcalóides, compostos fenólicos, compostos inorgânicos, cumarinas, flavonóides, glicosídeos cardiotônicos, antraquinonas, mucilagens, óleos essenciais, saponinas, taninos, substâncias amargas, compostos sulfurados, lignanas, neo-lignanas, gomas e glucoquininas (FERRO, 2008).

A molécula de isopentenil-pirofosfato e seu respectivo isômero, dimetilalila-pirofosfato (IV), formam trans-geranil-pirofosfato (V), originando os demais terpenos. Logo, novas ligações entre trans-geranil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultam em sesquiterpenos e diterpenos. Contudo, a ligação entre duas moléculas de farnesila-pirofosfato (VI) originará esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenos e esteroides (NAVARRETE et al., 2011).

Nota-se que as principais funções dos metabólitos secundários são: I) alelopatia, ou seja, a supressão do crescimento das plantas vizinhas, II) funções celulares específicas da planta, por exemplo, resistência à salinidade do solo, III) ação tóxica sob agentes patogênicos (bactérias, fungos, vírus e insetos), IV) afastamento de animais herbívoros, insetos e V) atração de animais polinizadores para dispersão do pólen da planta (PICHERSKY; GANG, 2000, NAHA, 2014).

Do ponto de vista bioquímico convém saber distinguir a parte do vegetal a ser empregada, pois os princípios ativos distribuem-se pelas diferentes partes da planta medicinal de forma distinta, sendo possível encontrar substâncias letais em algumas partes (PINTO et al., 2000).

As atividades biológicas das plantas medicinais geralmente são atribuídas aos seus metabólitos secundários. Estes, na maioria das vezes, possuem estrutura química complexa com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de compostos bioativos com ação farmacológica (AGRA; FRANÇA; BARBOSA FILHO, 2007). Atrelado a este fato, a fitoquímica é de ampla relevância, pois envolve o esclarecimento, a caracterização estrutural, a avaliação das propriedades biossintéticas e o registro de substâncias naturais produzidas pelas plantas medicinais (RODRIGUES; SOUZA FILHO; FERREIRA, 2009; BRAZ FILHO, 2010).

Em particular, aos grupos de metabólitos secundários podem ser visualizados na Tabela 1. Estes exibem diversas aplicações dentre as quais se destacam a capacidade de atuar como agentes antibacterianos ou antifúngicos, agentes redutores do colesterol, imunossupressores, antiparasitários e herbicidas (VAISHNAV; DEMAIN, 2010).

Tabela 1 – Principais grupos de metabólitos secundários.

GRUPOS	SINTETIZADOR	VIA ROTA
TERPENÓIDES	Sintetizados a partir do Acetil Coenzima A (Acetil-CoA)	Ácido mevalônico
COMPOSTOS FENÓLICOS	Substâncias aromáticas formadas	Ácido chiquímico ou ácido acético
COMPOSTOS NITROGENADOS	Alcalóides são sintetizados a partir de aminoácidos	-

O balanço entre a formação e eliminação desses compostos fenólicos e nitrogenados durante o crescimento da planta medicinal é um equilíbrio influenciado por fatores genéticos, portanto fixos, e ambientais, a exemplo de luminosidade, temperatura, tipo de solo, disponibilidade de água, além outras variáveis e/ou sazonais (FERNANDES JÚNIOR, 2012). Sob esta ótica, a biossíntese dos metabólitos secundários é um processo complexo e está relacionado a fatores genéticos (PROBST et al., 2011).

Os terpenóides são os constituintes mais representativos dos óleos essenciais, sendo o maior grupo de metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais (CUNHA et al., 2009). No entanto, o ambiente o qual a planta medicinal se encontra reflete a biossíntese de diferentes compostos, aos diversos fatores, atuarem sozinhos ou interagirem entre si (MIRANDA et al., 2013).

Silveira; Bandeira; Arrais (2008) afirmam que 65% a 80% da população mundial, ainda acreditam nos produtos à base de plantas medicinais no tratamento de doenças. E também, podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novos defensivos naturais ou serem precursores de semi-síntese, no desenvolvimento de produtos que não agridam ao meio ambiente e que não sejam tóxicos para os consumidores (BETTIOL; MORANDI, 2009).

O interesse pelas plantas medicinais para investigações de novos compostos antibacterianos é devido à variedade de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários, tais como as antraquinonas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos, que podem agir também como antioxidantes, anti-inflamatórios, antifúngicos entre outras atividades biológicas (MOSCHONAS et al., 2015).

3.4 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são considerados os primeiros medicamentos utilizados pelo homem primitivo e muitos deles devido às suas propriedades biológicas, ainda têm valor terapêutico (CUNHA et al., 2012). E, também constituem uma matéria-prima de grande importância na produção de cosméticos, novos fármacos e aditivos para alimentos (PINTO et al., 2014).

Os óleos essenciais são definidos como substâncias voláteis de uma mistura complexa de componentes químicos (terpenos, monoterpenos, álcoois, aldeídos e

cetonas) que se evaporam quando em contato com o ar e são biossintetizados por plantas (PARIKH; DESAI, 2011; ACEVEDO; NAVARRO; MONROY, 2013).

Os óleos essenciais têm despertado os interesses da indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, por serem uma fonte alternativa com fins terapêuticos, devido suas propriedades medicamentosas, e seus diversos grupamentos químicos característicos, tais como, álcoois, aldeídos (eugenol, estragol, geraniol) e fenóis entre outros menos significativos nesta pesquisa, assim a idade da planta medicinal também influencia na composição química e no teor médio de óleo (CHAGAS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2012), até mesmo os constituintes majoritários podem variar conforme a época de colheita (BEZERRA et al., 2008), condições climáticas e solo (SIMÕES et al., 2010).

O teor médio de óleo essencial presente nas folhas verdes da planta medicinal é de 0,8% a 1,0% (MATASYOH et al., 2011; PINTO et al., 2014). No entanto, sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes (SIMÕES, et al., 2010).

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) (2013), os óleos essenciais são classificados como aditivos *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Dessa forma, podem ser usados como substitutos de compostos artificiais atendendo as exigências do consumidor (DONSI et al., 2014). Assim sendo, as principais características de um óleo essencial são fragrância, atividades antimicrobiana e antioxidante, respectivamente. Portanto, são largamente utilizados nas indústrias farmacêutica, cosméticos e, ainda, como aditivos naturais na elaboração de alimentos (NAVARRETE et al., 2011).

A indústria alimentícia visa à produção de alimentos com maior tempo de prateleira, livres de microrganismos patogênicos e suas toxinas (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2007). Neste contexto, os óleos essenciais têm sido utilizados no preparo de alimentos levando-se em consideração os atributos sabor, aroma diferenciado e conservação, proporcionando o aumento da vida de prateleira do produto, inibindo o crescimento de microrganismos indesejáveis e consequente deterioração dos alimentos (TRAJANO et al., 2009).

Os óleos essenciais estão presentes nas plantas medicinais em diferentes concentrações ocupam funções distintas (OLIVEIRA; MOREIRA; OLIVEIRA, 2013). Tendo como função atrair determinados insetos para que estes retirem da planta o

seu pólen facilitando a polinização (BAKKALI et al., 2008, CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012).

Os compostos oxigenados são os principais responsáveis pelos atributos aroma, sabor e os terpenos quanto expostos ao aquecimento, oxigênio e/ou luz, produzem aromas desagradáveis e, geralmente são os mais abundantes na composição dos óleos essenciais, por serem hidrofóbicos, sendo facilmente difundidos pela parede celular dos microrganismos e causam danos à membrana, principalmente no que diz respeito à fluidez e permeabilidade (MILLEZI et al., 2012).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são as ações antiespasmódica sobre o aparelho digestivo, cardiovascular e/ou antiparasitária sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), anti-inflamatório, antisséptico, dentre outros (CUNHA; CAVALEIRO; SALGUEIRO, 2005; BANDONI; CZEPAK, 2008). Dessa forma, é necessária a padronização das amostras para uma resposta antimicrobiana mais exata (LORENZI; MATOS, 2008; BRUN; MOSSI, 2010).

Entre os diversos produtos naturais empregados em abordagens terapêuticas destacam-se os óleos essenciais que são descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (VLASE et al., 2014; DUARTE et al., 2016).

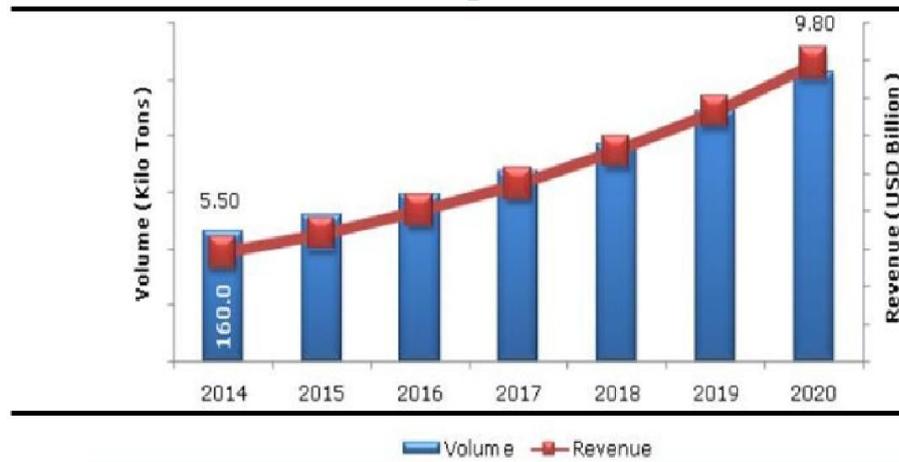
Os óleos essenciais há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular por possuírem diversas propriedades farmacológicas e apresentarem vantagens quando comparados a alguns medicamentos, como por exemplo, a volatilidade, que os torna ideais para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalação (BANDONI; CZEPAK, 2008).

Os óleos essenciais são usados como aroma natural em alimentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal devido a suas propriedades químicas específicas (BOTREL et al., 2015). No entanto, uma possibilidade viável para substituir ou associar-se a antioxidantes sintéticos e antimicrobianos convencionais, com a finalidade de diminuir a quantidade dessas substâncias nos alimentos (SACCHETTI et al., 2004; LANG; BUCHBAUER, 2012).

Como constituintes químicos dos óleos essenciais existem uma ou várias substâncias em maior quantidade denominados compostos majoritários, geralmente determinam as propriedades biológicas desses produtos naturais (CABRAL et al., 2015).

O Gráfico 1 mostra o comportamento do Mercado Global de óleo essencial no ano de 2014 e faz uma previsão de como deverá se comportar em 2020.

Gráfico 1 – Mercado Global de óleo essencial (2014-2020).



Fonte: *Zion Reseach Analysis* (2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), Central Analítica, Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão, Câmpus Bacanga (UFMA), Laboratório de Química e Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Câmpus Maracanã (IFMA), Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - DETA da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Câmpus São José do Rio Preto (UNESP) e no Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo (USP).

4.1 Caracterizações geográficas das áreas de estudo

Na Figura 4 é possível visualizar o mapa da localização geográfica da cidade de São Luís – MA.

Figura 4 – Mapa do município de São Luís – MA.



Fonte: *Google Earth*, 2017.

A pesquisa de campo foi realizada no período de novembro de 2013 a junho de 2014, na cidade de São Luís do Estado do Maranhão, sendo delimitada pelas coordenadas geográficas: Latitude: 02° 31' 47" S e Longitude: 44° 18' 10" W (Figura 4).

Nesta perspectiva a Secretaria Municipal de Saúde de São Luís (SEMUS) decompôs a cidade em sete Distritos Sanitários de Saúde (DSS): Centro (Mercado Central), Itaqui - Bacanga, Coroadinho, Conjunto Habitacional (COHAB), Bequimão, Tirirical e Vila Esperança, consoante a áreas delimitadas referentes às feiras e/ou mercados.

4.2 Seleção das plantas medicinais

A seleção de plantas medicinais foi realizada de acordo com o uso terapêutico evidenciado pelos usuários e raizeiros lotados na ilha de São Luís – MA, em seus respectivos Distritos Sanitários de Saúde (DSS).

Foram coletadas e utilizadas folhas de alecrim, capim-limão, cravo-da-índia, eucalipto e manjerição adquiridos em feiras e/ou mercados de São Luís do Maranhão, tendo como período máximo até às 8 h da manhã, empacotados em sacos plásticos, protegidos da luz e transportados até ao laboratório para processamento.

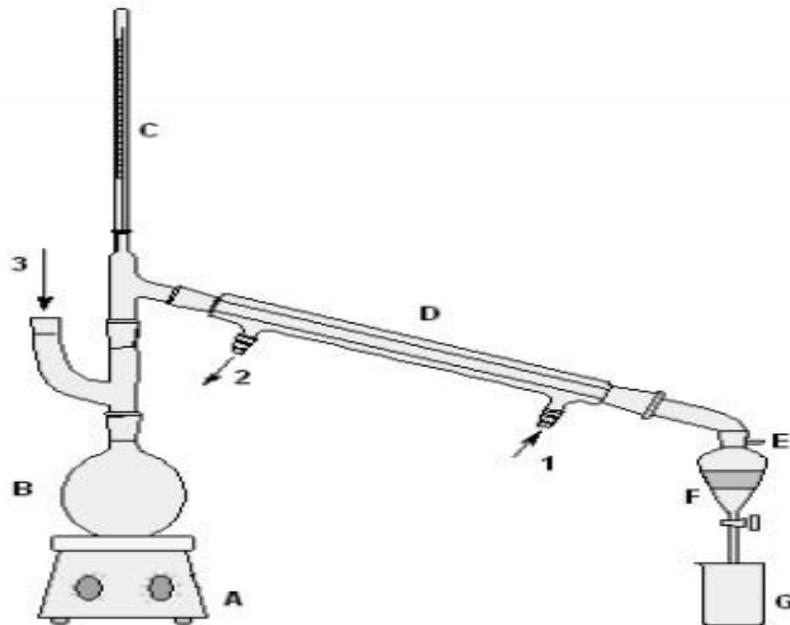
Após a coleta, o material vegetal (as amostras) foi imersos em solução de hipoclorito de sódio a 0,01% por tempo de 45 min. As folhas foram secas inicialmente em temperatura ambiente sob a bancada por 6 h e logo após na estufa, de circulação forçada de ar, na temperatura de 50 °C, por 24-48 h, seguida de moagem no moinho elétrico de facas, TECNAL modelo TE-340 para trituração das amostras (folhas secas) a temperatura ambiente e armazenado em frascos âmbar.

4.3 Obtenção dos óleos essenciais

O óleo essencial foi seco por meio de percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicata e as amostras armazenadas em frascos âmbar em temperaturas entre 2 a 8 °C por, no máximo, uma semana e, posteriormente, analisadas para a identificação dos constituintes para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis.

A mistura água/biomassa entra em ebulição, em seguida, os vapores de água e as substâncias voláteis carregadas são conduzidos até o condensador, onde há uma troca de calor, condensando os vapores com a água de refrigeração.

Figura 5 – Aparelho Clevenger modificado.



Fonte: Schiedeck (2011).

Para a extração dos óleos essenciais utilizou-se o aparelho Clevenger modificado (Figura 5). O modelo proposto do aparelho consiste basicamente de manta de aquecimento (A), balão volumétrico com capacidade de 500 mL (B), termômetro (C), condensador (D), equalizador de pressão (E), funil de separação (F) de 125 mL e béquer (G). O tempo de extração foi determinado em função do rendimento de cada óleo essencial selecionado, com auxílio da balança analítica de precisão. Na obtenção do melhor rendimento do óleo essencial foram realizadas 20 extrações dos 5 óleos essenciais cada um com 3 repetições extrativas.

Seguindo a metodologia do Disco-difusão do óleo essencial no ágar, os discos de papel estéreis utilizados apresentavam um diâmetro de 6 mm whatmann, colocados na superfície do ágar previamente inoculado. Sendo um volume total de 20 μL de cada óleo essencial foi usado para impregnar individualmente, sendo que diferentes discos foram impregnados com alíquotas de 10 μL de óleo essencial puro e 10 μL de óleo essencial com adição do agente emulsificador Tween 80 (0,5 %).

As culturas com os discos em placas invertidas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Os resultados dos ensaios realizados em triplicata foram obtidos pela mensuração dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institut* (CLSI, 2014).

4.4 Atividade antibacteriana

Na avaliação do efeito antibacteriano das espécies vegetais selecionadas, foi realizada, inicialmente, uma triagem, seguindo os critérios de aceitação que mensuram a atividade antimicrobiana de todos os óleos essenciais brutos extraídos das folhas frente às bactérias selecionadas através do Teste por Disco-difusão (Tabela 2).

Tabela 2 – Critérios da aceitação da atividade antimicrobiana

CMI DO ÓLEO ESSENCIAL	RESULTADOS
< 100µg/mL	Boa
100µg/mL ≤ x ≤ 500µg/mL	Moderada
500µg/mL ≤ x ≤ 1000µg/mL	Fraca
>1000µg/mL	Inativa

Fonte: Adaptada de Holetz et al., (2002).

Os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) e manjerição (*Ocimum basilicum* L), foram escolhidos em detrimento a outros 15 óleos essenciais testados em decorrência dos resultados positivos de um estudo experimental prévio efetuado, foi observado o potencial do efeito antibacteriano dos distintos óleos essenciais de plantas medicinais frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas contaminantes de alimentos e patogênicas.

4.4.1 Microrganismos

Os testes de atividade microbiológica foram realizados com as cepas bacterianas oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) bactérias Gram-negativas, além das

Staphylococcus aureus (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC10876), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) bactérias Gram-positivas.

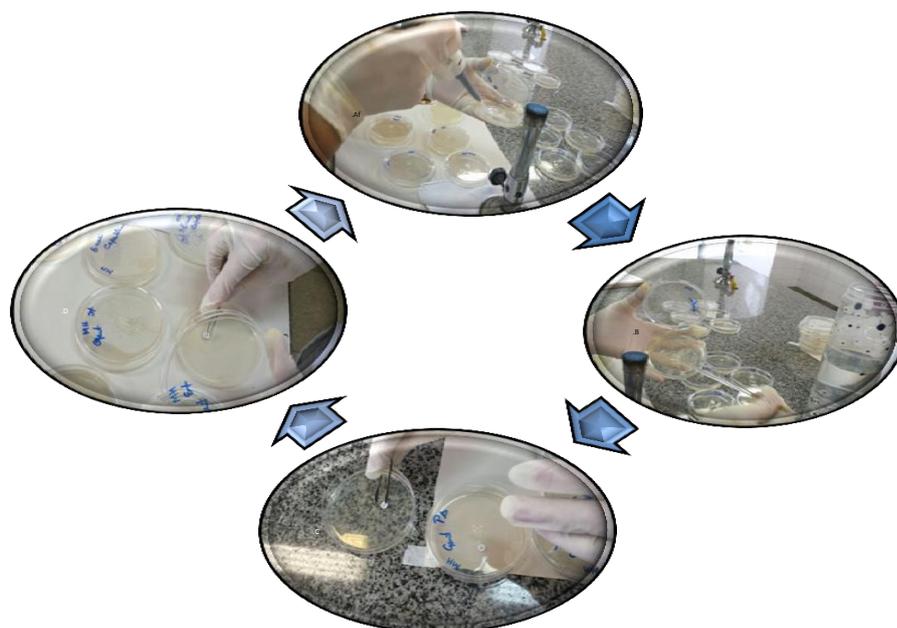
4.4.2 Meios de cultivo e preparação do inóculo

Primeiramente, foram preparadas as placas com o meio Ágar Mueller-Hinton (MHA) previamente esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min e 1 atmosfera. Em seguida o resfriamento até 45 °C foram despejados 25 mL do meio nas placas de Petri descartáveis de 100 mm de diâmetro.

As cepas bacterianas foram mantidas em caldo MHA acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20 °C. Para uso, as cepas foram repicadas em MHA (2 mL), incubadas por 24 h a 37 °C. Para coincidir com a densidade óptica da suspensão do inóculo à da suspensão de 0,5 McFarland, foi utilizado o método de comparação visual, em iluminação ambiente apropriada, os tubos de ensaios de mesmo diâmetro e com auxílio de um cartão branco com linhas contrastantes pretas ao fundo.

As culturas bacterianas foram inoculadas em caldo Brain and Heart Infusion (BHI), após incubação por 24 horas a 37°C, repicou-se de 2 a 4 alçadas em 1 mL de solução salina – NaCl estéril (0,85% p/v) e agitou-se a solução em agitador do tipo vórtex, até obter uma suspensão padronizada (Figura 6).

Figura 6 - Procedimentos básicos na inoculação das placas.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Cada suspensão do microrganismo foi semeada com auxílio de um *swab* descartável estéril, comprimindo-o contra as paredes internas do tubo para retirar o excesso do inóculo. As estrias foram realizadas de forma suave nas cinco direções da placa em toda a superfície do meio ágar Muller-Hinton.

Segundo Bona et al., (2014) são diversos as pesquisas que vem sendo realizadas no desenvolvimento de novos compostos antibacterianos advindos de extratos vegetais e demais produtos naturais. A turvação foi comparada à da escala 0,5 de McFarland, o qual corresponde a 0,5mL da solução de BaCl_2 20,048 mols/L e 99,5 mL da solução de H_2SO_4 a 1% (v/v), para obter uma concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.4.3 Atividade antibacteriana por Disco-difusão

Os agentes antimicrobianos de maior peso molecular se dispersam mais lentamente do que aqueles com um peso molecular menor, resultando em zonas de inibição com halos de tamanhos diferenciados e estas zonas não constituem necessariamente uma medida do grau de inibição do agente bioativo devido à diferença na velocidade de dispersão de seus constituintes, assim a atividade antimicrobiana na técnica de difusão em disco ocorre através da difusão do agente quimioterápico em todas as direções do ágar, durante a incubação (BLACK, 2002).

Foram preparadas soluções testes de óleos essenciais com concentração de 200µg/mL solubilizados com Tween 80, e da mesma forma foi preparada para Tween 20 de modo a comparar a ação dos dois emulsificantes. Observou-se, que no Tween 20, após quinze minutos de repouso, algumas gotículas de óleo essencial se desprendiam da superfície de emulsão, não ocorrendo com Tween 80. Logo, foi usado para dar continuidade nos experimentos. Em seguida, realizadas diluições até obter-se as concentrações mínimas de 25, 50, 75 e 100µg/mL.

4.4.4 Determinação da MIC por disco-difusão

Na Tabela 3 a mensuração dos halos seguindo o teste da atividade antibacteriana onde foi considerado como resultado final de cada de óleo essencial a média das três medidas e como suscetível halo menor de 9 mm de diâmetro de acordo com os critérios de SANTOS et al., (2007).

Tabela 3 – Critérios da atividade antibacteriana pelo tamanho do halo de inibição.

HALO DE INIBIÇÃO (MILÍMETROS)	RESULTADOS
< 9 mm	Inativo
9 mm ≤ x ≤ 12 mm	Parcialmente ativo
13 mm < x ≤ 18mm	Ativo
> 18mm	Muito ativo

Fonte: Adaptada de Santos et al., (2007).

Os resultados da atividade antibacteriana das amostras testadas de óleos essenciais estão apresentados em tabelas, com a média dos halos de inibição em milímetro ± Desvio -Padrão (DP).

4.4.4.1 Preparo das soluções de óleos essenciais

As diluições decimais seriadas dos óleos essenciais, de forma que os discos impregnados foram colocados com uma pinça na superfície da placa contendo o meio inoculado, pressionando ligeiramente com a ponta da pinça para garantir uma boa adesão e incubadas, de forma invertida, em estufa bacteriológica a 35 °C por 24 horas.

4.4.4.2 Inoculação das placas

Os discos contendo os antibióticos selecionados nas suas respectivas concentrações foram embebidos com 25 µL da MIC do óleo essencial, sendo em seguida colocados em placas de Petri estéreis contendo ágar Muller-Hinton inoculado com 1 mL das suspensões bacterianas. Após incubação das placas a 37 °C por 48 horas foi observada a interferência da MIC dos de óleos essenciais e o efeito dos antibióticos sobre as cepas bacterianas ensaiadas.

As placas foram invertidas e incubadas em posição invertida a 35 °C por 24 h, em seguida, sendo a placa satisfatoriamente semeada, os halos de inibição resultantes ficaram uniformemente circulares, assim com o inóculo correto houve a formação de um tapete confluyente de crescimento, para realiza-se a leitura das

placas. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital considerando se o diâmetro total do disco (em mm), o ensaio foi realizado em triplicata, sendo considerada a média aritmética dos valores (CLSI, 2014).

4.4.5 Antimicrobianos padrão

As indicações para os grupos antimicrobianos padrão - os antibióticos comerciais da série Gram-positivas utilizados foram Clindamicina (2µg/mL); Cloranfenicol (30µg/mL); Ciprofloxacina (5µg/mL); Eritromicina, (15µg/mL); Gentamicina (10µg/mL); Oxacilina (1µg/mL); Tetraciclina, (30µg/mL) e Vancomicina (30 µg/mL). E da série Gram-negativas utilizadas foram Amicacina (30µg/mL); Ampicilina (10µg/mL); Cefoxitina (30µg/mL); Ciprofloxacina, (5µg/mL); Cloranfenicol (30µg/mL); Netilmicina (30µg/mL); Sulfazotrim (23,75µg/mL) e Tetraciclina (30µg/mL).

Os antibióticos comerciais utilizados, devidamente impregnados em Discos-difusão foram adquiridos juntos ao mercado especializado de São Luís – MA, foram Ampicilina, 10 µg/L (AMP 10), Cefotaxina, 30 µg/L (CTX 30), Cefalotina, 30 µg/L (CFO 30), Cloranfenicol 10 µg/L (CLO 10), Eritromicina, 15µg/L (ERI 15), Gentamicina, 15 µg/L (GEN 15), Penicilina 10µg/L (PEN 10), Tetraciclina, 30µg/L (TET 30) e Vancomicina, 30 µg/L (VAN 30).

Os anexos A e B apresentam uma visão holística dos antibióticos selecionados de acordo com seus respectivos halos de inibição e classificados em resistente, intermediário e sensível. A diferença entre os anexos está na série, pois, o anexo A refere-se à série Gram-positiva e o B a série Gram-Negativa, respectivamente.

4.5 Características físico-químicas dos óleos essenciais

Na caracterização das propriedades físico-químicas dos óleos essenciais selecionados realizaram-se as análises de densidade, índice de refração, solubilidade em etanol (70%), cor, aparência e odor.

4.5.1 Densidade

Foi determinada de acordo com metodologia preconizada pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985), o cálculo de densidade relativa dos óleos essenciais foi aplicado à fórmula ($D = m/v$), fixando-se um volume constante de cada óleo essencial (1 mL) a uma temperatura de 25° C, utilizando-se a balança analítica. O resultado corresponde à média de três determinações. As densidades dos óleos essenciais foram determinadas com o emprego de um picnômetro de 1,0 mL previamente seco e tarado.

4.5.2 Índice de refração

Esta característica físico-química reflete a qualidade e a identidade de cada óleo essencial. Para medir o índice de refração foi utilizado um refratômetro marca AABE, modelo 2WAJ, a temperatura a 25 °C. Com um capilar foram colocadas duas gotas do óleo no refratômetro equipado com termômetro. Com o refratômetro ajustado às condições experimentais, foram fechados os prismas que compõem o instrumento e realizada a leitura pela escala do aparelho.

4.5.3 Solubilidade em etanol (70%)

Utilizaram-se balões volumétricos de 10 mL contendo um volume constante dos óleos essenciais, sob o qual foi adicionado proporcionalmente um volume crescente da mistura de álcool/água destilada a 70% (v/v) até a sua completa solubilização.

4.5.4 Cor e Aparência

A técnica empregada foi avaliação visual comparando-se a coloração dos óleos essenciais com cores descritas e conhecidas sobre um fundo branco. No caso da aparência foi avaliada a transparência ou limpidez dos óleos.

4.5.5 Odor

A determinação do odor característico foi subjetiva para cada planta empregada, como descrito por Costa et al. (2010).

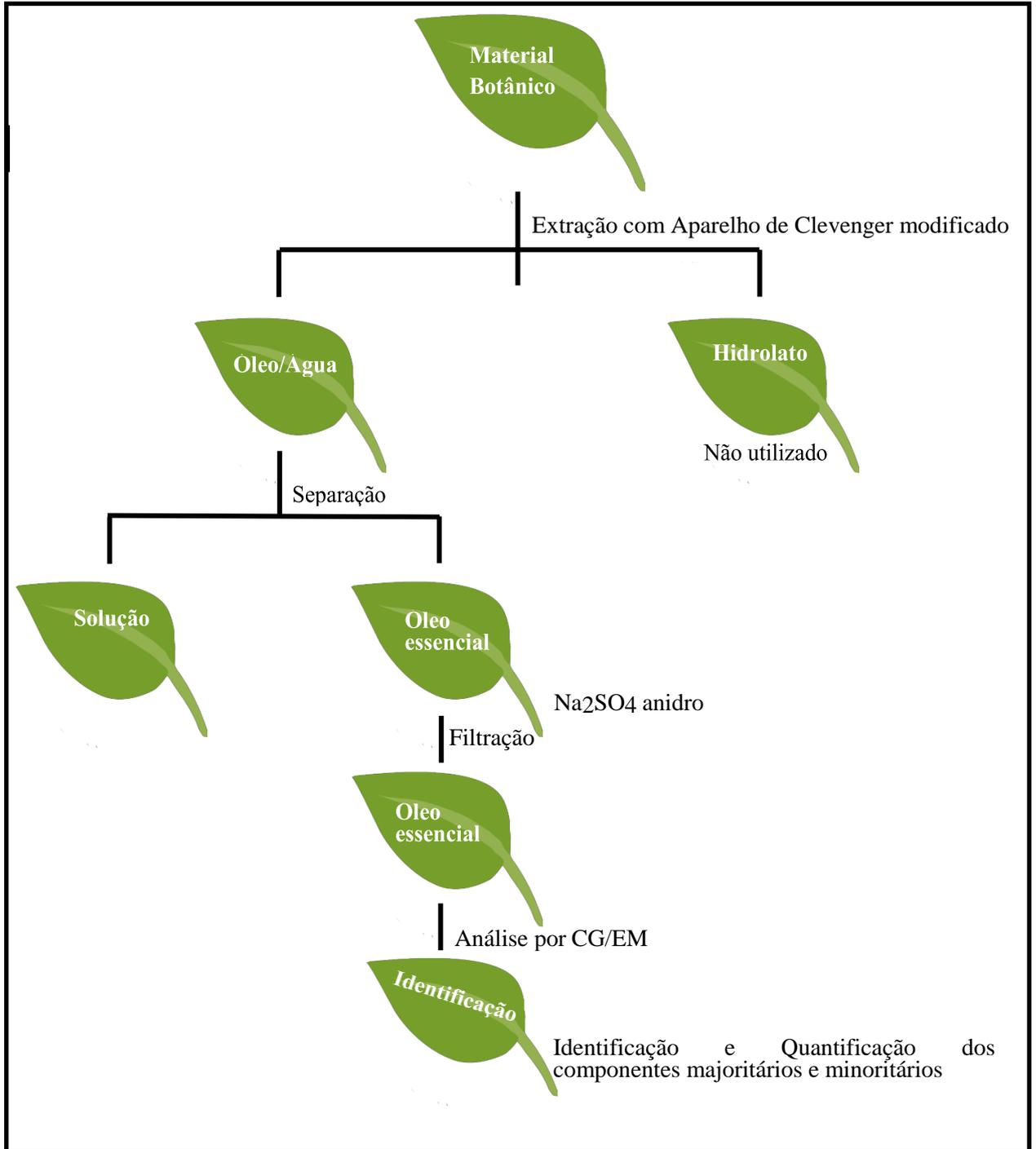
4.6 Perfil cromatográfico dos óleos essenciais

A análise qualitativa dos óleos essenciais selecionados foi realizada na Universidade de São Paulo no Centro Analítico de Instrumentação da USP, na cidade de São Paulo, por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/EM.

As análises dos constituintes voláteis das amostras dos óleos essenciais foram realizadas em cromatógrafo a gás da marca SHIMADZU, acoplado a um espectrômetro de massa CG/EM QP5050, equipado com coluna capilar fenil polish fenileno-siloxano de BPX 5% (30 m comprimento x 0,25 mm de espessura e 0,25 µm de espessura do filme), utilizando hélio de alta pureza como gás de arraste.

A temperatura do injetor e interface do CG com detector seletivo foram mantidos em 280 °C com fluxo na coluna de 2,7 mL/min, programada para operar em 50 °C, para as análises, foram injetadas alíquotas com volume de 1 µL em acetato de etila, fixando-se as seguintes condições modo de divisão com pressão da coluna de 150 kPa, velocidade linear 59,1 com fluxo total de arraste 30 mL/min e modo de varredura 0,5 décimos de segundos, a quantificação de cada constituinte individualmente foi obtido por meio de normalização de áreas (%).

A identificação dos constituintes encontrados foi baseada na comparação dos índices de Kovats (IK), também conhecido como índice de retenção de Kovats e espectros de massa de cada substância com os dados da literatura. Posteriormente a esta comparação, fez-se uma lista tríplice de constituintes com sua respectiva probabilidade de ser ou não um determinado constituinte. Se $p > 70\%$, existe uma grande probabilidade de ser este o constituinte identificado. O banco de dados é restrito e, em determinados casos, indica quais seriam os possíveis constituintes, por aproximação (Figura 7).

Figura 7– Fluxograma do material botânico (folhas) a identificação por CG/EM.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7 Análise Estatística

Em condições definidas estatisticamente neste estudo, têm-se as equações 1, 2 e 3, como cálculo da média \bar{X} e estimativa do desvio padrão (S) ou Coeficiente de variação (% CV) (RIBANI, et al., 2004).

$$\text{Média: } \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

(Eq. 1)

$$\text{Desvio Padrão: } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

(Eq. 2)

$$\text{Coeficiente de variação: } \%CV = \frac{(S \cdot 100)}{X}$$

(Eq. 3)

Os resultados foram expressos em milímetros pela diferença da média aritmética dos valores dos halos de inibição obtidos nas três repetições de cada bactéria testada por análise de variância (ANOVA).

Inicialmente, formulou-se a hipótese nula H_0 : recuperação igual a 100% e com uma hipótese alternativa H_1 : recuperação diferente de 100%. Foi utilizado o Delineamento em Blocos ao Acaso, tendo cinco tratamentos referentes aos óleos essenciais de alecrim, capim limão, cravo da Índia, eucalipto e manjeriço, em dois blocos que agrupam bactérias da série Gram-positiva e Gram-negativa, sendo as médias analisadas estatisticamente, adotando nível de significância com $p < 0,05$ e o teste F (*Fisher-Snedecor*), posteriormente, comparadas pelo teste de Interação, possibilitando a análise da relação entre tratamentos e blocos, utilizou-se o programa R- commander versão 3.2.5 64 bit.

Tabela 4 - Tabela da Análise de Variância (ANOVA).

FV	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	SQ(trat)	$k - 1$	QM(trat)	$F_{trat} = \frac{QM(trat)}{QM(rest)}$
Blocos	SQ(bloco)	$b - 1$	QM(b)	$F_b = \frac{QM(b)}{QM(rest)}$
Resíduos	SQ(erro)	$n - k - b + 1$	QM(erro)	
Total	SQ(total)	$n - 1$	QM(total)	

Em que:

$$C = \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$SQ_{Total} = \sum y^2 - C$$

$$SQ_{tratamento} = \frac{\sum T^2}{br} - C$$

$$SQ_{bloco} = \frac{\sum B^2}{kr} - C$$

$$SQ_{erro} = SQ_{Total} - SQ_{tratamento} - SQ_{bloco}$$

Considerou-se que não houve diferença estatística significativa entre as duas precisões levantadas, ao nível de 5% de significância, quando o resultado da equação a Tabela 4 expresso pelo F calculado é precisamente menor do que o valor de F tabelado, em relação aos Tratamentos, Blocos e Resíduos.

De forma semelhante ao verificar se o F calculado é menor do que o F tabelado aceita a hipótese não ocorrendo diferenças estaticamente significativas entre o valor médio do resultado analítico e o valor médio desejado (100%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estatisticamente, os dados foram compilados sob o modelo experimental de Delineamento em Blocos ao Acaso, os resultados obtidos através da Análise da Variância (ANOVA) apresentaram $F_{\text{cal}} = 2,67$ e $F_{\text{tab}} = 2,74$ para os tratamentos, para os blocos $F_{\text{cal}} = 8,67$ e $F_{\text{tab}} = 4,24$, sendo assim aceita a hipótese suposta, não ocorrendo variação significativa no comportamento das variáveis em estudo.

Posteriormente analisando a interação entre tratamentos e blocos, obteve-se $F_{\text{cal}} = 0,58$ e $F_{\text{tab}} = 2,74$, sendo possível determina que não exista interferência significativa dos blocos sobre os tratamentos. Logo, o teste de análises de médias Tukey não se fez necessário, pois, todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5%. Os cálculos realizados para a obtenção de tais resultados seguem no Apêndice 1.

Em pesquisas de Gonçalves et al., (2008) e Kluczynik et al., (2010), fazem a comparação entre a atividade antibacteriana dos extratos das plantas medicinais com os antibióticos comerciais mais utilizados. Assim, um baixo desvio padrão indica que os dados tendem a estar próximo da média, já um desvio padrão alto indica que os dados estão espalhados por vários de valores (WOLFFENBÜTTEL, 2006).

Sabe-se que compostos bioativos podem ser encontrados em qualquer parte da planta medicinal, porém, as folhas foram preferencialmente escolhidas por apresentarem maior número de metabólitos secundários, que são responsáveis pelo efeito da atividade antibacteriana. Assim, estudos que avaliam os efeitos de produtos extraídos de espécies vegetais, têm determinado que estes demonstrem capacidade antimicrobiana frente aos mais diversos patógenos (POZZATI, 2008; OLIVEIRA, 2014; TRINDADE, 2015).

Portanto, os resultados encontrados são positivos na maioria das vezes para os fitoterápicos, indicando uma alternativa a esses antibióticos existentes no mercado, além de possuírem menos efeitos adversos do que os antimicrobianos sintéticos (GUNALAN; SARASWATHY; KRISHNAMURTHY, 2011).

5.1 Atividade Antibacteriana dos óleos essenciais

5.1.1 Estudo do óleo essencial bruto do alecrim

A Tabela 5 mostra o efeito antibacteriano do extrato das folhas do alecrim, ressaltando que a técnica empregada na extração, dentre outros fatores, influencia diretamente na ação antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007; JARRAR; ABU-HIJLEH; ADWAN, 2010).

Tabela 5 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do alecrim.

Cepas bacterianas	Halo de inibição (mm)	Classificação
<i>S. aureus</i>	27,33±1,15	Muito Ativo
<i>B. cereus</i>	25,33±1,15	Muito Ativo
<i>E. faecalis</i>	14,01±0,99	Ativo
<i>E. coli</i>	13,01±0,99	Ativo
<i>S. enterica</i>	15,02±0,98	Ativo
<i>P. aeruginosa</i>	11,33±0,69	Parcialmente Ativo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Segundo a classificação proposta na Tabela 5, o óleo essencial de alecrim inibiu fortemente o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, além de ser ativo frente às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis.

O óleo essencial de alecrim apresentou frente à bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* apresentou um halo de inibição de 11,33±0,69 mm devido sua atividade antibacteriana parcialmente ativa, em função do tamanho do halo de inibição no intervalo de $9 \text{ mm} \leq x \leq 12 \text{ mm}$.

Algumas pesquisas têm demonstrado a atividade antibacteriana do óleo essencial de alecrim frente a diferentes microrganismos e seu poder de inibição mostrou-se fraco ou ausente contra bactérias Gram-negativas, quando comparado à ação contra as Gram-positivas e com a atividade de outros óleos essenciais, devidas

possivelmente à ação dos ácidos lipoteicóicos e a extremidade lipofílica da membrana celular das bactérias Gram-positivas pode facilitar a penetração de compostos hidrofóbicos (COX et al., 2000; ZAGO et al., 2009).

Tabela 6 – Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do alecrim.

PARÂMETROS FÍSICOS TESTADOS	VALORES
Densidade (g/mL)	0,9125
Índice de refração (N_D 25°)	1,468
Cor	Amarelo pálido
Odor	Característico
Aparência	Límpido
Solubilidade em etanol (70%)	1:2

Fonte: Elaborado pelo autor.

De posse dos resultados da Tabela 6, construíram-se os valores dos parâmetros físicos no processo laboratorial de obtenção de alecrim, levando em consideração que a densidade de 0,9125 g/mL e o índice de refração de 1,468. Pois o mesmo é possivelmente depende dos derivados oxigenados.

5.1.2 Estudo do óleo essencial bruto do capim limão

Tabela 7 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do capim-limão.

Cepas bacterianas	Halo de inibição (mm)	Classificação
<i>S. aureus</i>	31,33±0,58	Muito ativo
<i>B. cereus</i>	24,03±1,98	Muito ativo
<i>E. faecalis</i>	12,03±1,08	Parcial. Ativo
<i>E. coli</i>	16,33±0,58	Ativo
<i>S. enterica</i>	14,32±0,56	Ativo
<i>P. aeruginosa</i>	13,33±0,58	Ativo

Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante dos resultados alcançados na Tabela 7, os halos das espécies Gram-positivas foram maiores do que os halos das Gram-negativas. A bactéria *S. aureus* foi à espécie mais sensível, apresentando o maior halo de inibição $31,33\pm 0,58$ mm, enquanto *E. faecalis* foi a menos sensível com halo de inibição de $12,03\pm 1,08$ mm de diâmetro.

As bactérias Gram-negativas são mais resistentes devido à maior complexidade da sua membrana externa da parede celular, que atua como uma barreira à difusão dos componentes hidrofóbicos dos óleos essenciais (NAIK et al., 2010). Segundo os mesmos autores ao avaliarem o óleo essencial de capim-limão, verificaram que a atividade antibacteriana sobre as bactérias *S. aureus* possuem halo de inibição de 14,3 a 29,6 mm e *E. coli* 8 a 22,33 mm. Demonstrando resultados divergentes aos do presente estudo, que obteve em relação à bactéria *S. aureus* o halo de inibição foi de $31,33\pm 0,58$ mm sendo convergente ao estudo de Naik e colaboradores. Em relação à bactéria *E. coli* o halo de inibição foi de $16,33\pm 0,58$ mm, resultado dentro da faixa proposta por Naik e demais autores, não havendo divergência em relação aos diâmetros de halos de inibição observados na presente pesquisa.

Tabela 8 – Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do capim-limão.

PARÂMETROS FÍSICOS TESTADOS	VALORES
Densidade (g/mL)	0,9245
Índice de refração (N_D 25°)	1,489
Cor	Amarelo
Odor	Característico
Aparência	Límpida
Solubilidade em etanol (70%)	1:2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados alcançados para obter os seguintes parâmetros físico-químicos selecionados, tais como índice de refração, solubilidade, densidade entre outros, são

utilizados para o controle de qualidade nesta pesquisa em relação ao extrato de óleo de capim-limão (Tabela 8).

Nascimento et al., (2003) observaram-se para fins de obtenção de óleo essencial, que as folhas tanto frescas quanto secas e o seu rendimento é de 0,28 a 0,50% da massa fresca. Estes mesmos autores recomendam que a colheita do *Cymbopogon citratus* seja realizada no horário de 08:00 às 13:00h quando é observado uma maior concentração de citral, pois as altas temperaturas influenciam na qualidade do óleo essencial.

5.1.3 Estudo analítico do óleo essencial bruto do cravo-da-índia

Segundo Klančnik et al., (2010), a metodologia disco difusão tem como importância maior em fornecer dados iniciais da ação antimicrobiana de produtos naturais, pela facilidade e rapidez de execução.

Tabela 9 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia.

Cepas bacterianas	Halo de inibição (mm)	Classificação
<i>S. aureus</i>	22,67±0,58	Muito Ativo
<i>B. cereus</i>	17,83±1,68	Ativo
<i>E. faecalis</i>	17,67±1,58	Ativo
<i>E. coli</i>	21,33±0,58	Muito Ativo
<i>S. enterica</i>	21,04±0,58	Muito Ativo
<i>P. aeruginosa</i>	9,66±0,58	Parcial. Ativo

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir da dispersão dos resultados exibidos na Tabela 9, estatisticamente o óleo essencial do cravo-da-índia obteve efeito bactericida ocasionando um desvio padrão satisfatório nas amostras testadas e comprovadas.

Segundo Alzoreky; Nakahara (2003), halos com valores menores que 12 mm não são indicativos de atividade antibacteriana. No entanto, com relação aos diferentes óleos essenciais que apresentem o eugenol como componente

majoritário, sendo maior a área de alcance da difusão do eugenol, maior será o halo de resistência ao desenvolvimento bacteriano gerado pelo material (TANGERINO, 2006).

A literatura relata que possivelmente a observação da natureza hidrofóbica permite que o eugenol penetre na parede da célula bacteriana Gram-negativa e altere a sua estrutura, resultando na saída de componentes intracelulares (DEVI et al., 2010).

Tabela 10 – Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do cravo-da-índia.

PARÂMETROS FÍSICOS TESTADOS	VALORES
Densidade (g/mL)	0,9675
Índice de refração (N_D 25°)	1,5260
Cor	Transparente
Odor	Característico
Aparência	Límpida
Solubilidade em etanol (70%)	1:2

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo Reis (2008), os óleos essenciais extraídos dos talos e dos frutos secos do cravo-da-índia relatou um índice de refração 1,5230 a 1,5252 respectivamente, valores semelhantes encontrados nesta Tabela 10. Esses resultados também corroboram com o resultado da análise da solubilidade em etanol (70%) e comprovam que as substâncias presentes caracterizam-se mais por compostos oxigenados tendo afinidade com etanol na relação 1:2.

5.1.4 Estudo analítico do óleo essencial bruto do eucalipto

A partir da dispersão dos resultados obtidos na Tabela 8 pode-se pressupor que o desvio padrão é abaixo (≤ 1) para todas as bactérias patogênicas testadas, onde as medições das cepas bacterianas foram mais próximas entre si, confirmando os dados estatísticos.

Sugere-se que o potencial antibacteriano dos óleos essenciais sobre microrganismos Gram-positivos ou Gram-negativos pode estar relacionado com o grau de efetividade particular que seus componentes individuais exercem sobre os diferentes tipos de microrganismos (DORMAN; DEANS, 2000).

Tabela 11 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do eucalipto.

Cepas bacterianas	Halo de inibição (mm)	Classificação
<i>S. aureus</i>	17,67±0,95	Ativo
<i>B. cereus</i>	8,14±0,33	Parcial Ativo
<i>E. faecalis</i>	7,98±0,33	Parcial Ativo
<i>E. coli</i>	9,33±0,58	Parcial Ativo
<i>S. enterica</i>	9,36±0,88	Parcial Ativo
<i>P. aeruginosa</i>	9,88±0,58	Parcial Ativo

Fonte: Elaborada pelo autor.

No experimento realizado com o óleo essencial de eucalipto foi demonstrado que houve formação do maior halo de inibição frente à bactéria *S. aureus* Tabela 11. Porém pode-se observar que os halos formados no experimento utilizando o método da difusão em disco apresentaram diâmetros com similaridade em relação às bactérias Gram-negativas *E. coli* com 9,33±0,58 mm e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis com 9,34±0,88 mm.

Tabela 12 – Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do eucalipto.

PARÂMETROS FÍSICOS TESTADOS	VALORES
Densidade (g/mL)	0,9395
Índice de refração (N_D 25°)	1,4865
Cor	Amarelo pálido
Odor	Característico
Aparência	Límpida
Solubilidade em etanol (70%)	1:2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Lima et al., (2003) relataram que o óleo essencial da espécie *Eucalyptus citriodora* apresenta atividade antibacteriana comprovada por pesquisadores, que demonstraram sua ação frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis. Além disso, *Eucalyptus citriodora* é caracterizado uma das espécies mais utilizadas no Nordeste Brasileiro como planta medicinal (ESTANISLAU et al., 2001) (Tabela 12).

5.1.5 Estudo analítico do óleo essencial bruto do manjeriço

Considerando a diversidade de grupos químicos encontrados nos óleos essenciais, acredita-se que a atividade antimicrobiana dos mesmos não pode ser atribuída a mecanismo específico, mas sim a ocorrência de vários danos à célula microbiana (SKANDAMIS et al., 2001, CARSON et al., 2002).

No entanto, apesar de muitas aplicações dos óleos essenciais não são isentos de efeitos colaterais e seu uso inadequado pode resultar em reações tóxicas ou alérgicas (LANG; BUCHBAUER, 2012).

Tabela 13 – Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço.

Cepas bacterianas	Halo de inibição (mm)	Classificação
<i>S. aureus</i>	19,67±1,15	Muito Ativo
<i>B. cereus</i>	21,33±1,15	Muito Ativo
<i>E. faecalis</i>	19,33±0,58	Muito Ativo
<i>E. coli</i>	22,33±0,58	Muito Ativo
<i>S. enterica</i>	9,34±0,88	Parcial Ativo
<i>P. aeruginosa</i>	11,18±0,58	Parcial Ativo

O óleo essencial de manjeriço (Tabela 13) apresentou atividade antibacteriana sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, porém, em conformidade com este trabalho, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* mostrou-se resistente às diferentes concentrações testadas, apesar de ser parcialmente ativo.

Tabela 14 – Caracterização físico-química do óleo essencial bruto do manjeriço.

PARÂMETROS FÍSICOS TESTADOS	VALORES
Densidade (g/mL)	0,8955
Índice de refração (N_D 25°)	1,5160
Cor	Amarelo
Odor	Característico
Aparência	Límpida
Solubilidade em etanol (70%)	1:2

Fonte: Elaborada pelo autor.

Hussain et al., (2008), estudando o índice de refração (25° C) e densidade (25° C) obtiveram valores de 1,5045 e de 0,95 g/cm³ para o óleo essencial de manjeriço. Resultados estes que corroboram com os alcançados nesta pesquisa.

Tabela 15 – MIC do extrato de óleo essencial de alecrim.

Microrganismos	Concentração (µg/mL)				
	25	50	75	100	
+ GRAM	<i>S. aureus</i>	+	+	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	-	-	-
	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-
- GRAM	<i>E. coli</i>	+	+	+	-
	<i>S. enterica</i>	+	+	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-

Legenda: presença dos microrganismos (+) e ausência dos microrganismos (-).

De acordo com a Tabela 15, o óleo essencial de alecrim apresentou uma atividade antibacteriana frente à bactéria *Bacillus cereus* inibida com a menor dose na concentração inibitória a partir de 50µg/mL, é interessante buscar novas substâncias para verificar a sua ação bactericida ou bacteriostática, uma vez que o cenário mundial é preocupante, devido ao agravamento da resistência bacteriana.

Outrossim, reforça-se que, as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) na concentração de 75µg/mL, seguida de uma redução na concentração máxima deste estudo, garantem uma boa atividade antimicrobiana. Vale salientar, que as bactérias *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) tem uma atividade antibacteriana moderada.

Ponderando os resultados supracitados, revelaram-se que o óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) tem provavelmente um potencial antimicrobiano contra as bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas.

Tabela 16 – MIC do extrato de óleo essencial do capim-limão.

Microrganismos	Concentração (µg/mL)				
	25	50	75	100	
+ GRAM	<i>S. aureus</i>	+	+	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	+	-	-
	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-
- GRAM	<i>E. coli</i>	+	+	+	-
	<i>S. enterica</i>	+	+	+	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-

Legenda: presença dos microrganismos (+) e ausência dos microrganismos (-).

Diante dos resultados na Tabela 16, o extrato de óleo essencial do capim-limão apresentou um desempenho antimicrobiano bom, frente as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* na concentração de 75µg/mL, corroborando assim com 100µg/mL a bactéria Gram-positiva - *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e as Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), obtiveram uma atividade antimicrobiana moderada.

Note-se que, o óleo essencial de capim-limão teve o efeito antibacteriano na concentração máxima deste estudo, pois a inibição do crescimento microbiano foi mais acentuada nas bactérias Gram-negativas devida suspostamente ao fato de possuírem uma parede bacteriana diferenciada, tendo uma membrana externa

composta por lipopolissacarídeos (LPS) e uma grande sensibilidade à penicilina, além de uma maior resistência a desintegração mecânica.

Tabela 17 – MIC do óleo essencial do cravo-da-índia.

Microrganismos	Concentração (µg/mL)				
	25	50	75	100	
GRAM +	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	-	-	-
	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-
GRAM -	<i>E. coli</i>	+	-	-	-
	<i>S. enterica</i>	+	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	+	-

Legenda: presença dos microrganismos (+) e ausência dos microrganismos (-).

Verificou-se na Tabela 17 que possivelmente ao papel do eugenol como componente majoritário do cravo-da-índia, é um antioxidante conhecido por seus efeitos neuroprotetores, conseguiu exibir boa atividade bacteriostática ou inibidora contra muitos microrganismos, como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus* (ATCC 10876) na concentração de 25µg/mL; *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) na concentração de 50µg/mL; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) na concentração de 75µg/mL; contudo, na bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), na concentração de 100µg/mL apresentou uma atividade antibacteriana moderada.

Justificando-se as concentrações supracitadas, referente à boa atividade microbiana em que, tornou-se viável a ruptura da membrana citoplasmática devido ao modo de ação antibacteriana do eugenol. Como já mencionado, a literatura relata que a observação da natureza hidrofóbica permite que ele penetre na membrana da célula bacteriana Gram-negativa e altere a sua estrutura, resultando na saída de componentes intracelulares (DEVI et al., 2010).

O eugenol e demais componentes minoritários apresentam efeito antibacteriano, pois conseguem reduzir consideravelmente o número de microrganismos presentes, necessita-se de mais estudos para comprovar a eficácia e eficiência para serem aplicadas tanto na indústria alimentícia como a farmacêutica.

Além disso, é possível que parte do efeito antibacteriano do eugenol esteja relacionada com a sua natureza fenólica (BOAVENTURA et al., 2006).

Tabela 18 – MIC do óleo essencial do eucalipto

	Microrganismos	Concentração (µg/mL)			
		25	50	75	100
GRAM +	<i>S. aureus</i>	+	+	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	+	+	-
	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-
GRAM -	<i>E. coli</i>	+	-	-	-
	<i>S. enterica</i>	+	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-	-

Legenda: presença dos microrganismos (+) e ausência dos microrganismos (-).

Na Tabela 18 o extrato de óleo essencial do eucalipto demonstrou boa ação antibacteriana frente às bactérias Gram-negativas testadas dentre elas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) na concentração de 50µg/mL; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) na concentração de 75µg/mL, a mesma obtida pela bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Contudo, as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* (ATCC 10876) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), apresentaram atividade moderada.

Em estudos realizados sobre a atividade antibacteriana, as bactérias Gram-positivas confirmam o exposto na Tabela 18, pois, há uma maior sensibilidade quando as mesmas ficam expostas aos óleos *in vitro* que as demais bactérias Gram-negativas testadas neste ensaio. Todavia, a particularidade apresentada pela *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) na concentração de 75µg/mL, torna-se plausível as características particulares estruturais e funcionais da composição química do óleo essencial testado.

Tabela 19 – MIC do óleo essencial do manjericão.

Microrganismos	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	25	50	75	100	
+ GRAM	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
	<i>B. cereus</i>	+	-	-	-
	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-
- GRAM	<i>E. coli</i>	+	-	-	-
	<i>S. enterica</i>	+	-	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	+	+	-	-

Legenda: presença dos microrganismos (+) e ausência dos microrganismos (-).

Os resultados da Tabela 19 demonstraram que o óleo essencial de manjericão obteve atividade bactericida, frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$; *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) e *Bacillus cereus* (ATCC 10876) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$; e uma moderada atividade frente à bactéria *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Estudos realizados por Gaio (2008) e Trajano (2009) mostraram que dentre os óleos testados os efeitos inibitórios significativos frente à bactéria *Escherichia coli* evidenciaram o poder antimicrobiano do óleo essencial de manjericão, em particular ressalta-se que Trajano (2009) evidenciou que a bactéria *P. aeruginosa* também sofreu efeito inibitório corroborando aos dados alcançados neste estudo (Tabela 19).

5.2 Interferência dos de óleos essenciais sobre as bactérias patogênicas.

O estudo da interferência da efetividade dos de óleos essenciais sobre as bactérias patogênicas testadas foi realizado através da técnica de Disco-difusão em meio sólido utilizando discos de papel de filtro de 100 mm nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a MIC sua demonstração de resultados através da Tabela 20 de comparação referente aos cinco óleos essenciais e séries Gram-positivas e Gram-negativas.

Vale salientar que durante o processo de desenvolvimento e validação analítica foram utilizadas amostras de óleos essenciais coletadas do mercado e/ou

feiras nos sete pontos distintos do DSS, visando à diminuição de interferentes durante a execução dos protocolos fornecendo dados para a rastreabilidade do processo em função da atividade antibacteriana. Logo, o valor do $F_{\text{tab}} = 2,74$ para tratamentos e o $F_{\text{tab}} = 4,24$ para blocos encontrados em anexo na Tabela C.

Tabela 20 – Médias dos diâmetros dos halos de inibição.

Microrganismos	Halo de inibição (mm)				
	OEA	OECL	OECI	OEE	OEM
GRAM⁺ <i>S. aureus</i>	27,33	31,33	22,67	17,67	19,67
<i>B. cereus</i>	25,33	24,03	17,83	8,14	21,33
<i>E. faecalis</i>	14,01	12,03	17,67	7,98	19,33
GRAM⁻ <i>E. coli</i>	13,01	16,33	21,33	9,33	22,33
<i>S. enterica</i>	15,02	14,32	21,04	9,36	9,34
<i>P. aeruginosa</i>	11,33	13,33	7,66	9,88	11,18

Legenda: Médias de três repetições. OEA – Óleo essencial de Alecrim, OECL – Óleo essencial do capim-limão, OECI – Óleo essencial de cravo da Índia, OEE – Óleo essencial de Eucalipto, OEM – Óleo essencial de manjeriço.

5.2.1 Estudo estatístico dos óleos frente à bactéria *S.aureus* (ATCC 25923).

A partir da interpretação da análise estatística da dispersão dos dados e dos resultados obtidos nesta Tabela C em anexo. Pode-se inferir que o coeficiente de variação, também conhecido como desvio padrão relativo, neste estudo demonstrou que o óleo essencial de manjeriço possui o maior coeficiente de variação na ordem de 9,09% e uma similaridade bastante acentuada entre os óleos de alecrim e eucalipto, o qual representa o desvio-padrão em porcentagem da média, sendo assim, uma das medidas estatísticas mais utilizadas pelos pesquisadores, na avaliação da precisão dos experimentos.

De acordo com os dados do OECL (31,33±0,58 mm) apresentou maior halo de inibição seguido do OEA (27,33±1,15 mm), observou-se certa similaridade entre OEM (19,67±1,15 mm) e OEE (17,67±0,95 mm), sendo assim, tornaram necessárias a visualização e a utilização do desvio padrão na apresentação da média aritmética, informando o quão “confiável” é esse valor apresentado em relação à atividade antibacteriana dos óleos essenciais testados na escala laboratorial.

Consoante a este fato, a Tabela 20, onde os resultados apresentados de óleos essenciais exibem efeito estatístico não havendo uma diferença significativa entre todas as medições, por resultar em um valor de F_{cal} (F calculado) menor que o F_{tab} (F tabelado), além de apresentar o valor - p ($p > 0,05$) no nível de significância de 95%.

5.2.2 Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria *B. cereus* (ATCC 10876).

No que tange, a dispersão dos resultados obtidos na Tabela 20, pode-se observar que o desvio padrão foi baixo para o OEM ($19,67 \pm 1,15$ mm), sendo similar aos OEA ($25,33 \pm 1,15$ mm) e OCL ($24,03 \pm 1,98$ mm), observa-se que não apresentaram atividade antibacteriana do OEE.

O desvio padrão relativo revelou que o OECL possui o maior coeficiente de variação na ordem de 12,0%, seguida dos OEA (6,58%) e OEM (4,58%). O OEE como se apresentou na Tabela 20, não apresentou nenhum dos efeitos bacteriostático ou bactericida.

5.2.3 Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria *E. faecalis* (ATCC 29212).

A partir da dispersão dos resultados obtidos na Tabela 20, e utilizando-se da prática laboratorial realizada nesta pesquisa, visualmente observa-se que o OECL apresenta efeito bactericida, contudo, tivemos um efeito bacteriostático ou inibidor na concentração de $25 \mu\text{g/mL}$, tendo assim, ocasionado um desvio padrão com apresentação acima ou $\geq 1,00$ para todos os de óleos essenciais testados e comprovados.

Observando na Tabela 20, nas demais medições além de apresentar o valor - p ($p > 0,05$) entre os valores essa tendência se apresentam no anexo C em relação aos OECL e OEM, mantendo o nível de significância de 95%. O desvio padrão relativo revelou que o OECL possui o maior coeficiente de variação na ordem de 12,0%, seguida dos óleos de OEM (10,78%), OECL (8,33%) e OEA (4,68%).

5.2.4 Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria a bactéria *E. coli* (ATCC 25922).

A partir da dispersão dos resultados obtidos na Tabela 20 e no anexo C é possível inferir que o desvio padrão é ≤ 1 para todos os óleos testados e comprovados. Além, que o desvio padrão relativo revelou que o OEA possui o maior coeficiente de variação na ordem de 6,67% tem uma certa similaridade com o comportamento dos OEE (6,22%).

Outrossim, reforça-se que obtiveram uma ação bactericida no OEM ($22,33 \pm 0,58$ mm), OECl ($21,33 \pm 0,58$ mm), OECL ($16,33 \pm 0,58$ mm), OEA ($13,01 \pm 0,99$ mm), e OEE ($9,34 \pm 0,58$ mm) apresentaram halos de inibição significativos.

5.2.5 Estudo estatístico dos óleos essenciais frente à bactéria *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011).

Com base no exposto na Tabela 20, a partir da dispersão dos resultados obtidos pode inferir que como o desvio padrão é < 1 para todos os de óleos essenciais testados. O desvio padrão relativo revelou que o OEA possui o maior coeficiente de variação na ordem de 13,51%, seguidos dos demais óleos essenciais testados.

Estatisticamente, a atuação bem mais significativa dos óleos essenciais neste estudo foi devido à ação bactericida dos mesmos, onde a ordem crescente foi a seguinte: OECl ($21,04 \pm 0,58$ mm) que apresentou maior halo de inibição, seguido do OEM ($15,98 \pm 0,88$ mm), OEA ($15,02 \pm 0,98$ mm), OECL ($14,32 \pm 0,56$ mm) e OEE ($9,34 \pm 0,58$ mm).

5.2.6 Estudo estatístico dos óleos frente à bactéria *P. aeruginosa* (ATCC 9027).

De fato, a Tabela 20 revelou que os OEA, OECL, OECl, OEE, e OEM apresentaram halos de inibição em todas as amostras testadas, diferenciando-se nas concentrações selecionadas e nos diâmetros dos halos. Contudo, a atividade antibacteriana revelou um espectro de ação maior, igual ou menor aos antimicrobianos padrões, de acordo com os anexos A e B.

5.3 Análise química dos óleos essenciais por CG/EM.

Segundo os autores Simões e Spitzer (2000), a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que estes últimos predominam. É de consenso na literatura científica que as diferentes significâncias na composição volátil em seus respectivos grupos funcionais justificam as análises por CG/EM.

Nesta pesquisa foi possível identificar e quantificar os seguintes óleos essenciais alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) com 12 compostos, que representaram 91,76% da composição do óleo, tendo como componentes majoritários a cânfora (27,51%), limoneno (21,01%), mirceno (11,19%), α -pineno (10,37%).

O óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) obteve 8 compostos, que representaram 93,53% da composição do óleo, tendo como componentes majoritários o geraniol (43,96%) e o citral (35,71%).

O óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) com 4 compostos, que representaram 99,17% da composição do óleo, tendo como componentes majoritários o eugenol (75,85%) e acetato de eugenila (16,38%).

O óleo essencial do eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook) com 5 compostos, que representaram 96,08% da composição do óleo, tendo como componentes majoritários o citronelal (65,09%) e acetato de citronelila (18,55%).

O óleo essencial do manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) com 10 compostos, que representaram 94,17% da composição do óleo, tendo como componentes majoritários o estragol (59,76%) e o eucaliptol (15,33%) (Tabela 21).

Tabela 21 - Compostos identificados e quantificados por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas - CG/EM.

ÓLEOS ESSENCIAIS	COMPOSTOS QUANTIFICADOS E QUALIFICADOS ATUANTES NAS AMOSTRAS (%)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Alecrim)	Cânfora (27,51%), Limoneno (21,01%), Mirceno (11,19%), α -Pineno (10,37%), β -Pineno (5,27%), β -Cariofileno (4,60%), Canfeno (3,64%), Verbenona (3,0%), Isoborneol (2,10%), γ -Terpineno (1,71%), Linalol (1,15%), α -Felandreno (0,21%)
<i>Cymbopogon citratus</i> (D.C.) Stapf (Capim-Limão)	Geraniol (43,96%), Citral (35,71%), Óxido de Linalol (8,61%), Mirceno (2,71%), Linalol (0,90%), Isoamyl Geranate (0,77%), Acetato de Geraniol (0,56%), 2-Isopropenil-5-metil-hex-4-enal (0,31%).
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L. (Cravo-da-Índia)	Eugenol (75,85%), Acetato de Eugenila (16,38%), β -Cariofileno (4,84%), α -Humuleno (2,10%)
<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook (Eucalipto)	Citronelal (65,09%), Acetato de Citronelila (18,55%), Citronela (10,85%), Eucaliptol (1,09%), Espatuleno (0,50%).
<i>Ocimum basilicum</i> L. (Manjeriço ou Alfavaca)	Estragol (59,76%), Eucaliptol (15,33%), Linalol (5,52%), Trans- α Bergamoteno (4,58%), Limoneno (1,98%), Carvone (1,98%), β -Selineno (1,48%), α -Selineno (1,43%), β -Cariofileno (1,18%), α -cadinol (0,93%)

Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

Verificaram-se nas amostras dos óleos essenciais analisados, informações suficientes para se traçar o possível perfil de concentração em função do tempo de extração, no que tange ao tempo ideal de coleta das amostras, sugere-se evitar o fracionamento desses óleos essenciais posteriormente, o que com certeza reduzirá gastos energéticos, conseqüentemente, recursos.

Vale salientar que as composições químicas, dos óleos essenciais apresentados na Tabela 21, foram definidas pelos parâmetros de tempo, ao longo dos processos extrativos.

Observou-se a presença dos compostos majoritários e minoritários pelos cromatogramas das amostras dos óleos essenciais selecionados, levando em particular que somente foram indicados os compostos químicos com percentual de área superior a 0,2%.

Em termos de composição química, diversos mecanismos têm sido propostos a fim de explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, que são geralmente compostos por monoterpenos, sesquiterpenos, e seus derivados oxigenados (RAHMAN; KANG, 2009).

Ao analisar os compostos identificados, constatou-se que a maioria são monoterpenos, seguidos de sesquiterpenos e apenas três fenilpropanóides.

Os resultados alcançados demonstraram que a extração por hidrodestilação em escala laboratorial apresentam boa quantidade de compostos em relação a demais métodos de extração, em função das condições físico-químicas que envolvem o processo, corroborando com o percentual mássico e a qualificação das amostras dos óleos essenciais, obtidos através de análises em CG/EM.

A determinação da identidade de um material vegetal e a propriedade do fitoterápico estudado, foram utilizados fingerprints (impressão digital) cromatográficos, que assumem o papel de técnica cromatográfica padrão, pois, relacionam as características farmacológicas e químicas da planta medicinal de acordo com a literatura.

De acordo com a Equação 5 observou-se outro aspecto importante deste estudo a identificação química de cada substância a qual foi determinada através do índice de Kovats e o tempo de retenção dos respectivos óleos essenciais em estudo, percebe-se a consonância com o detector referente ao índice de retenção (IR).

$$IR = \left\{ \frac{100x \log(tr_x - tr_{cn-1})}{\log(tr_{cn} = tr_{cn-1})} \right\} + 100.C_{n-1}$$

(Eq. 5)

Onde:

tr_x = tempo de retenção do analito;

tr_{cn} = tempo de retenção do n -alcano posterior ao analito;

tr_{cn-1} = tempo de retenção do n -alcano anterior ao analito;

C_n = número de carbonos do n -alcano posterior;

C_{n-1} = número de carbonos do n -alcano anterior.

De acordo com a Tabela 22 observa-se a interpretação da composição relativa dos óleos essenciais e em destaque a porcentagem de área em termos percentuais.

Tabela 22 - Composição relativa dos constituintes dos óleos essenciais selecionados.

CONSTITUINTES	OEA	OECL	OECI	OEEM	OEM
Cânfora	27,51	Nd	Nd	Nd	Nd
Limoneno	21,01	Nd	Nd	Nd	1,98
Mirceno	11,19	2,71	Nd	Nd	Nd
α -Pineno	10,37	Nd	Nd	Nd	Nd
β -Pineno	5,27	Nd	Nd	Nd	Nd
β -Cariofileno	4,60	Nd	4,84	Nd	1,18
Canfeno	3,64	Nd	Nd	Nd	Nd
Verbenona	3,00	Nd	Nd	Nd	Nd
Isoborneol	2,10	Nd	Nd	Nd	Nd
γ -Terpineno	1,71	Nd	Nd	Nd	Nd
Linalol	1,15	0,90	Nd	Nd	5,52
α -Felandreno	0,21	Nd	Nd	Nd	Nd
Geraniol	Nd	43,96	Nd	Nd	Nd
Citral	Nd	35,71	Nd	Nd	Nd
Óxido de Linalol	Nd	8,61	Nd	Nd	Nd

Isoamyl Geranate	Nd	0,31	Nd	Nd	Nd
Acetato de Geraniol	Nd	0,56	Nd	Nd	Nd
2-Isopropenyl- 5-methylhex-4-enal	Nd	0,31	Nd	Nd	Nd
Eugenol	Nd	Nd	75,85	Nd	Nd
Acetato de Eugenila	Nd	Nd	16,38	Nd	Nd
α -Humuleno	Nd	Nd	2,10	Nd	Nd
Citronelal	Nd	Nd	Nd	65,08	Nd
Acetato de Citronelila	Nd	Nd	Nd	18,55	Nd
Citronela	Nd	Nd	Nd	10,85	Nd
Eucaliptol	Nd	Nd	Nd	1,09	15,33
Espatuleno	Nd	Nd	Nd	0,50	Nd
Estragol	Nd	Nd	Nd	Nd	59,76
Trans- α Bergamoteno	Nd	Nd	Nd	Nd	4,58
Carvone	Nd	Nd	Nd	Nd	1,98
β -Selineno	Nd	Nd	Nd	Nd	1,48
α -Selineno	Nd	Nd	Nd	Nd	1,43
α -cadinol	Nd	Nd	Nd	Nd	0,93

Legenda: Nd - não detectado; Os resultados estão expressos em porcentagem de área (%).

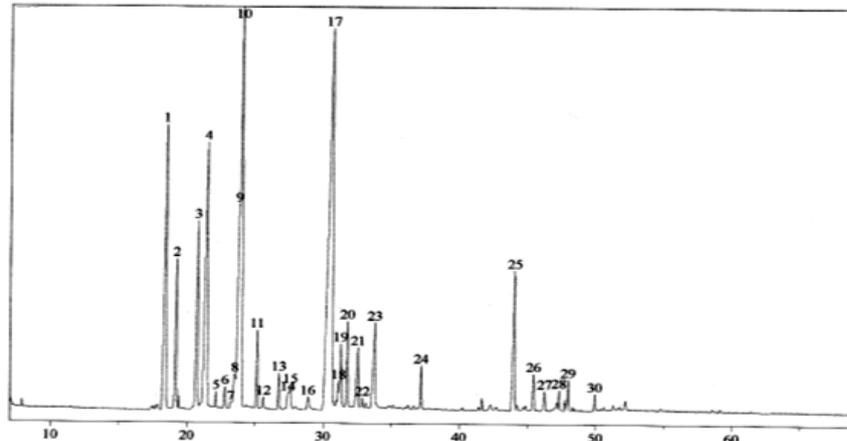
Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

5.3.1 Análise química do óleo essencial de alecrim por CG/EM.

O cromatograma da Figura 7 mostra a sequência de eluição dos componentes do óleo essencial do *Rosmarinus officinalis* L. visualizada no perfil cromatográfico que representa 91,67% do OEA. Em análise por CG/EM do óleo essencial do *Rosmarinus officinalis* foram observados 12 compostos e identificados,

a cânfora (27,51%), limoneno (21,01%), mirceno (11,19%), α -pineno (10,37%), β -pineno (5,27%), β -cariofileno (4,60%), canfeno (3,64%), verbenona (3,00%), isoborneol (2,10%), γ -terpineno (1,71%), linalol (1,15%), α -felandreno (0,21%).

Figura 8 – Cromatograma do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

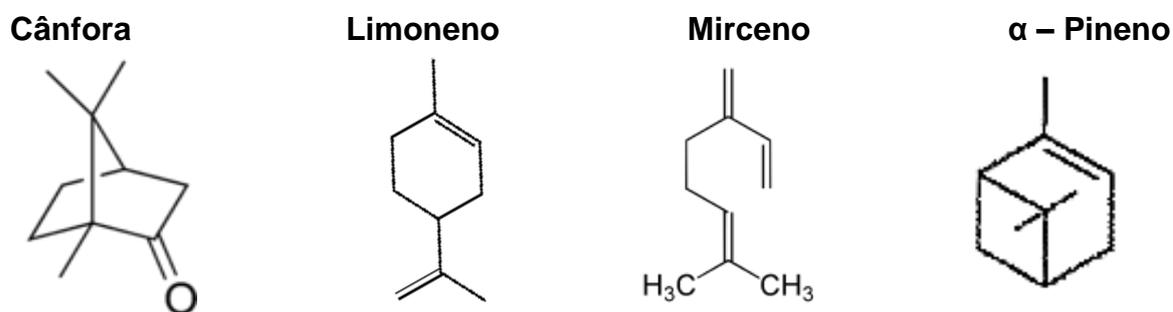


Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

Os componentes químicos majoritários apresentam grupo químico dos constituintes à cânfora, que é um monoterpene oxigenado, enquanto os demais limoneno, mirceno e α -pineno são monoterpenos hidrogenados (Figura 8). Realça-se que, particularmente, este grupo químico confere as propriedades farmacológicas peculiares, pois a substância cânfora apresenta efeito anestésico, antisséptico, bactericida, expectorante e também, atividades herbicida e inseticida sendo, em função disso, muito utilizado na indústria farmacêutica (ARAÚJO et al., 2010).

Observa-se, nesta pesquisa que, em relação ao grupo químico dos constituintes do óleo essencial do *Rosmarinus officinalis* L., verifica-se que a maior parte é monoterpenos do tipo não oxigenados (hidrocarbonados), representando 53,40%, monoterpenos oxigenados com 33,76% e sesquiterpenos hidrocarbonados 4,60% do total do óleo. Contudo, o constituinte majoritário é um monoterpene oxigenado a cânfora com 27,51% do total do óleo essencial (Figura 9).

Figura 9 – Estruturas dos compostos marcadores detectados no óleo essencial de OEA.



Fonte: Oliveira (2014); Costa (2015).

A análise quantitativa da proporção relativa dos constituintes do óleo essencial em estudo foi calculada pelas áreas dos respectivos picos cromatográficos, assumindo a identificação dos constituintes os quais foram realizadas pela interpretação dos espectros de massas obtidos da análise por CG/EM e por comparação com os IK (índices de Kovats).

Boix et al., (2010) apontam como principais componentes, dos 25 compostos identificados, β -pineno (7,00%), mirceno (9,52%), 1,8 cineol (14,02%), cânfora (33,17%) e verbenona (8,60%), resultado também encontrado por Santoyo et al., (2005), onde 80% do óleo de alecrim avaliado continha α -pineno, 1,8 cineol, cânfora, verbenona e borneol.

Resultados distintos foram obtidos por Hussain e colaboradores (2010), os quais encontraram como componente majoritário o 1,8 cineol representando 38,5%, consoante a estes dados encontrados os que esclarecem os valores distintos dos constituintes e a variação da composição, relatados em diversos estudos.

Resultados encontrados por Carvalho Junior (2004), afirmaram que as variações significantes na composição química do óleo essencial de alecrim, dependem da região de cultivo, do método de extração utilizado, do método de análise, da parte da planta utilizada (folha ou planta inteira) e do preparo da matéria prima (*in natura* ou seca) para obtenção de seus óleos essenciais.

Vale salientar que é fundamental a composição do óleo essencial seja precisamente conhecida, pois esta mesma pode variar de acordo com diversos fatores que podem alterar o teor do princípio ativo presente nele (NASCIMENTO et al., 2007).

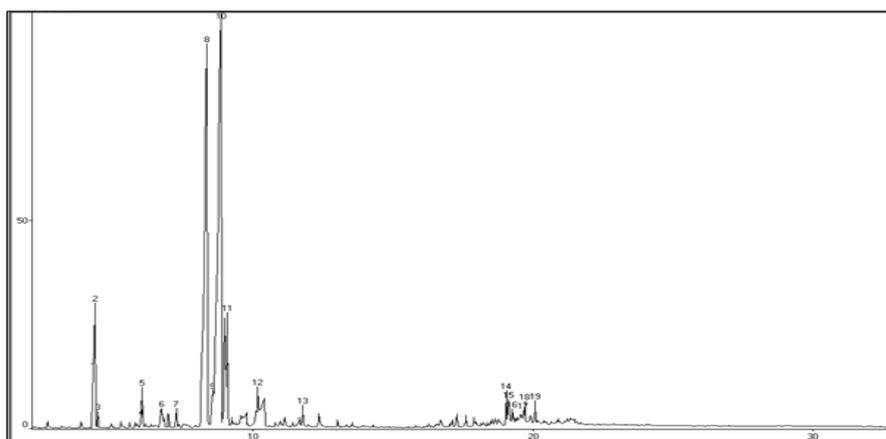
Além da atividade antioxidante, os compostos também exibem uma variedade de funções biológicas, tais como antibacteriano, citotóxicos, atividades antivirais e fungistática (RAZBORSEK et al., 2007).

Preferencialmente nas folhas do alecrim encontram-se as substâncias, carnosol, rosmarínico, rosmanol e rosmadial que são responsáveis pela atividade antioxidante capaz de neutralizar o oxigênio, devido à presença dos radicais hidroxilas corroborando com a inibição da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, reduzindo os danos da membrana celular.

5.3.2 Análise química do óleo essencial de capim-limão por CG/EM.

O cromatograma da Figura 10 visualiza o perfil cromatográfico do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf que representa 93,54% do óleo. Tem 8 constituintes sendo 7 monoterpenos (6 oxigenados e 1 não oxigenado) e 1 sesquiterpeno oxigenado. Em análise por CG/EM do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf foram observados 8 compostos e identificados, geraniol (43,96), citral (35,71), óxido de linalol (8,61), mirceno (2,71), linalol (0,90), isoamyl geranate (0,77), acetato de geraniol (0,56), 2-isopropil-5-metil-hex-4-nol (0,31).

Figura 10 - Cromatograma do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.



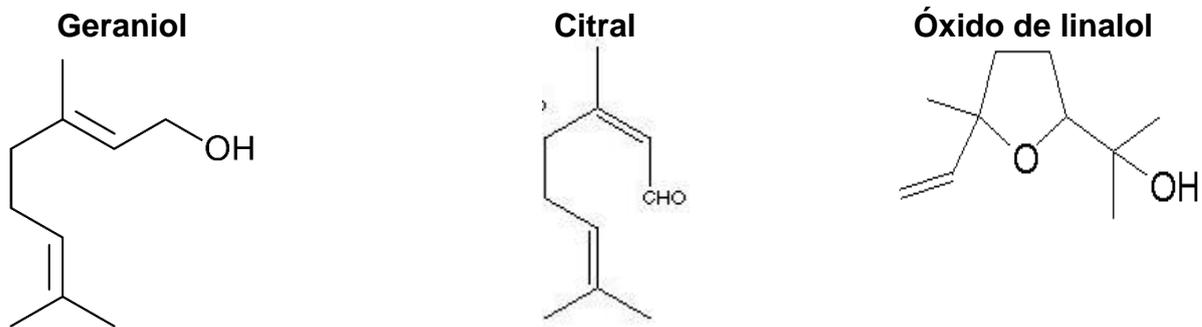
Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

Verifica-se que a maior parte são monoterpenos do tipo oxigenados representando 90,05%, monoterpenos não oxigenados (hidrocarbonados) com 2,71% e sesquiterpenos oxigenados 0,77% do total do óleo essencial. Reafirma-se que o

cromatograma (Figura 10) em estudo apresenta certa semelhança na ordem dos dois primeiros constituintes majoritários em percentuais diferentes com óleo essencial proveniente da Etiópia.

Segundo Abegaz e Yohannes (1983), o geraniol foi o composto principal de plantas de origem africana, correspondendo a 40% do total da composição do óleo essencial. Sendo assim, na identificação dos constituintes pela interpretação dos espectros de massas obtidos da análise por CG/EM e por comparação com os IK (índices de Kovats), observou-se que neste estudo, o valor percentual de geraniol (43,96%), foi maior que o encontrado na literatura de vários trabalhos na área da Ciência de Alimentos (Figura 11).

Figura 11 – Estruturas dos principais compostos marcadores detectados do OECL.



Fonte: Oliveira (2014); Costa (2015).

Segundo Onawunmi; Yisak; Ogunlana (1984), os compostos geraniol e neral presentes no óleo essencial de capim-limão também apresentam efeito antimicrobiano positivo e o mirceno, quando misturado a um destes compostos, reforça este efeito. Observou-se nesse estudo a presença do geraniol (43,96%), reforçando com o mirceno (2,71%), possivelmente reforçando sua atuação antibacteriana.

Segundo pesquisas desenvolvidas por Semikolenov et al., (2003) o geraniol é convertido em linalol pelo processo de isomerização, uma vez que estes compostos são muito sensíveis à temperatura. Possivelmente, isso se justifica pela ausência de um processo de secagem rigoroso das folhas de capim-limão, nas amostras que apresentaram 0,90% de linalol.

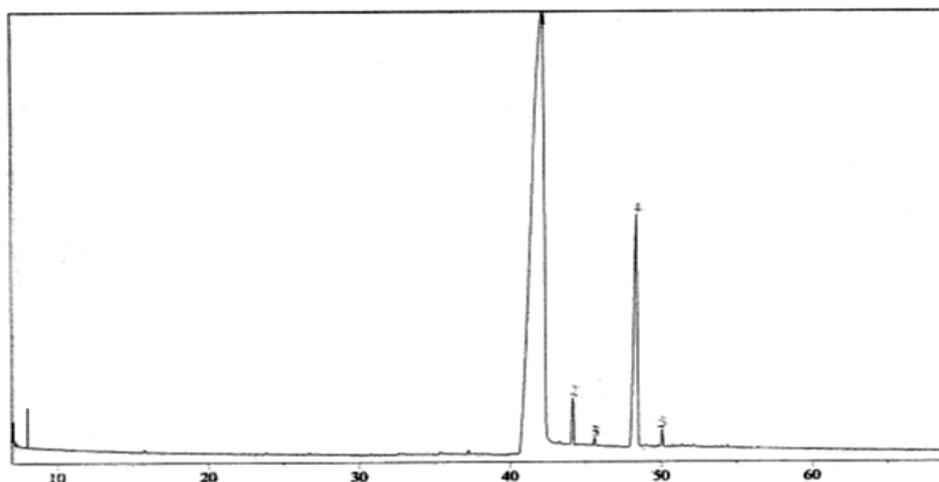
De fato, o segundo componente majoritário OECL é o citral (35,71%), o qual possui como constituintes majoritários o citral (mistura isomérica de neral (cis-citral ou Zcitral) e geranial (trans-citral ou E-citral)) e o mirceno (PRINS et al., 2008).

5.3.3 Análise química do óleo essencial de cravo-da-índia.

O cromatograma da Figura 12 mostra o perfil cromatográfico do óleo essencial do (*Caryophyllus aromaticus* L.). representando 99,17% do óleo. Tem 4 constituintes sendo 2 fenilpropanóides e 2 sesquiterpenos não oxigenados (hidrocarbonados). Logo, temos 50% fenilpropanóides que constituem 92,23 % dos compostos identificados e quantificados e 50% sesquiterpenos não oxigenados que constituem 6,94 % dos compostos identificados e quantificados.

Em análise por CG/EM do OECL foram observados 4 compostos e identificados, o eugenol (75,85), acetato de eugenila (16,38), β -cariofileno (4,84), α -humuleno (2,10).

Figura 12 – Cromatograma do óleo essencial de (*Caryophyllus aromaticus* L.).



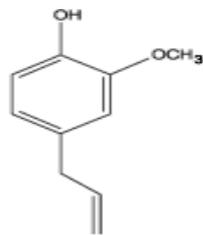
Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

A análise cromatográfica quantitativa envolve a preparação de uma série de soluções-padrão de composições próximas que servem como uma ferramenta analítica para comparar com as concentrações dos analitos nas amostras na calibração externa.

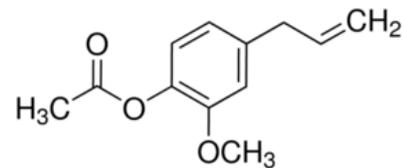
É possível visualizar na Figura 13 que a resolução alcançada permitiu a separação completa dos quatro componentes, não existindo sobreposição dos picos cromatográficos.

Pode-se citar, também, que os cromatogramas dos padrões do OECl foram obtidos diante de suas alturas ou as áreas dos picos cromatográficos em função da concentração.

Figura 13 – Estruturas dos principais compostos marcadores detectados do OECl.



Eugenol



Acetato de Eugenila

Fonte: Oliveira (2014); Costa (2015).

Nesta pesquisa foi determinada a composição do óleo essencial do OECl (Figura 14), estando constituído pelos seguintes componentes químicos: eugenol, acetato de eugenila, β -cariofileno e α -humuleno.

Segundo Pereira (2007), a atividade antimicrobiana do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas, e/ou no material genético celular. A presença do eugenol composto fenólico volátil possui características ácidas (reagem com bases fortes), como agente antimicrobiano em potencial tem a característica à presença de fenilpropanóide que possui uma considerável atividade antibacteriana.

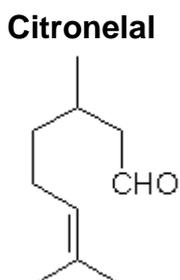
De acordo com Affonso et al., (2012), o eugenol, β -cariofileno e α -humuleno são os principais componentes químicos. Em face disso, o presente estudo revelou que o eugenol (75,85%), acetato de eugenila (16,38%), β -cariofileno (4,84%), α -humuleno (2,10%).

Entretanto, avaliações mais rigorosas devem ser efetuadas de modo que se possa determinar se o acetato de eugenila e o β -cariofileno também exercem efeito antibacteriano e se esses constituintes atuam sinergicamente.

5.3.4 Análise química do óleo essencial de Eucalipto

Em análise por CG/EM do óleo essencial do *Eucalyptus citriodora* Hook foram observados 5 compostos e identificados, o citronelal (65,09%), acetato de citronelila (18,55%), citronela (10,85%), eucaliptol (1,09%), espatulenol (0,50%) (Figura 15).

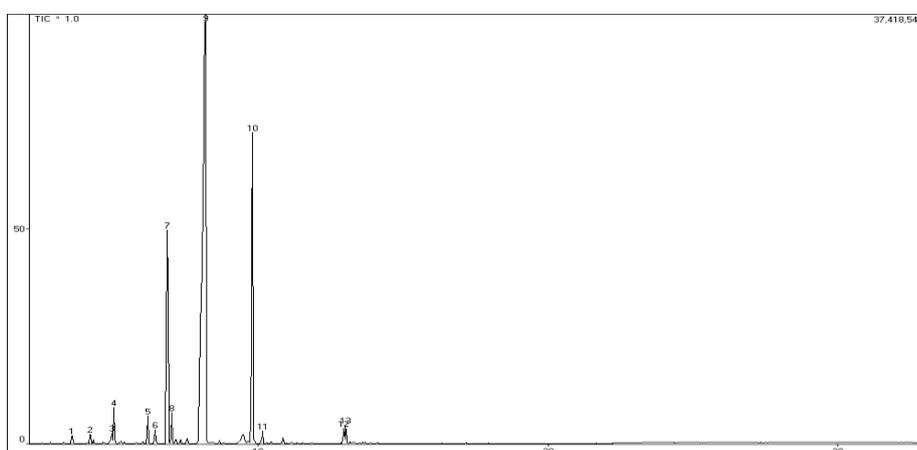
Figura 14 – Estrutura do principal composto marcador detectado do OEE.



Fonte: Costa (2015).

O cromatograma da Figura 16 mostram os perfis cromatográficos do óleo essencial do *Eucalyptus citriodora* Hook representando 96,08% do óleo essencial. Tem 5 constituintes sendo 4 monoterpenos oxigenados e 1 sesquiterpeno oxigenado. Logo, tem-se 80% monoterpenos que constituem 95,58% dos compostos identificados e quantificados e 20% sesquiterpenos que constituem 0,50% dos compostos identificados e quantificados.

Figura 15 – Cromatograma do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* Hook.



Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

Primeiramente, a análise qualitativa da espécie *Eucalyptus citriodora* Hook foi fundamentada na altura e separação dos picos cromatográficos correspondentes aos compostos existentes majoritários e minoritários, na visualização consegue-se observar a identidade de cada pico com sua respectiva concentração relativa.

Na região do cromatograma entre 7,0 a 10,0 minutos, observa-se, de forma geral, que a maior parte das espécies de eucaliptos possui poucos compostos, exceto objeto desse estudo o *Eucalyptus citriodora* Hook que apresentou dois picos cromatográficos característicos que permitiram a identificação da espécie que foram o citronelal e o acetato de citronelila. É conveniente advertir que essa espécie também possui o eucaliptol (1,8 cineol), mas em uma quantidade de apenas 1,09%.

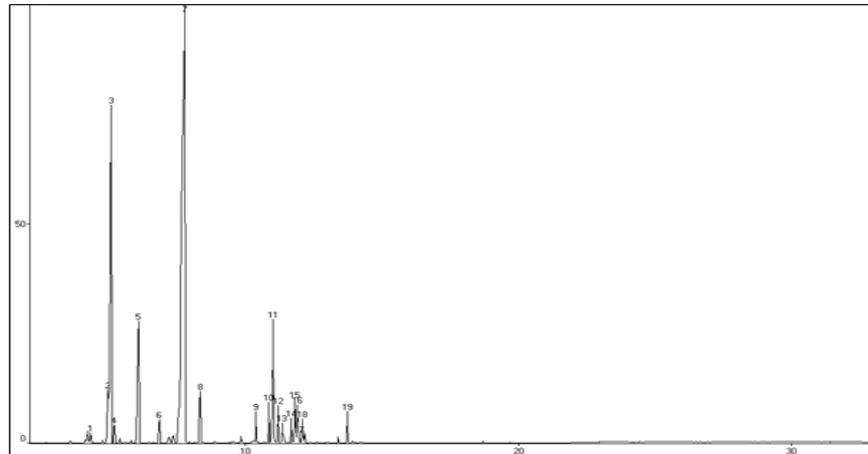
É importante salientar que as informações derivadas de um fingerprint cromatográfico foram utilizadas para a confirmação da identificação botânica de acordo com a avaliação qualitativa da amostra e o padrão da biblioteca pela interpretação dos espectros de massas obtidos da análise por CG/EM e por comparação com os IK (índices de Kovats), das feiras e/ou mercados de São Luís – MA.

5.3.5 Análise química do óleo essencial de manjeriço por CG/EM.

O cromatograma da Figura 17 mostra o perfil cromatográfico do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. representando 94,17% do óleo essencial. Tem 10 constituintes sendo 4 monoterpenos (3 oxigenados e 1 hidrocarbonados) e 5 sesquiterpenos (2 oxigenados e 4 hidrocarbonados), e um fenilpropanóide. Verifica-se que a maior parte é fenilpropanóide representando 59,76%, monoterpenos oxigenados, 22,83%, monoterpeno hidrocarbonado, 1,98%, sesquiterpeno hidrocarbonado, 8,67% e sesquiterpeno oxigenado apenas 0,93% do total do OEM.

Em análise por CG/EM do óleo essencial do (*Ocimum basilicum* L.) foram observados 10 compostos e identificados, estragol (59,76%), eucaliptol (15,33%), linalol (5,52%), trans-alfa-bergamoteno (4,58%), limoneno (1,98%), carvone (1,98%), β -selineno (1,48%), α -selineno (1,43%), β -cariofileno (1,18%), α -cadinol (0,93%).

Figura 16 – Cromatograma do óleo essencial de (*Ocimum basilicum* L.).

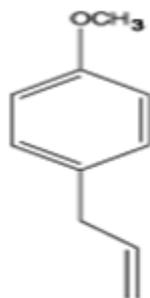


Fonte: Centro Analítico de Instrumentação da USP.

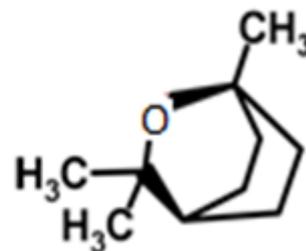
De acordo com essa pesquisa, o estragol também conhecido por metil chavicol ou ainda segundo a IUPAC 1-metoxi- 4- (2-propenil) – benzeno, que é utilizado nas indústrias farmacêuticas e alimentícias foi identificado como composto majoritário ocupando o pico 7 do cromatograma com um tempo de retenção de 7,75 min.

O espectro de massa referente a este pico do íon molecular M^+ comprova a relação $m/z = 148$, que representa a fórmula molecular do estragol $C_{10}H_{12}O$. De outra forma, um detector cromatográfico de espectro de massas pode ser incumbido de controlar a seleção dos íons ou a corrente total de todos os íons (HARRIS, 2001).

Figura 17 – Estruturas dos principais compostos marcadores detectados do OEM.



Estragol



Eucaliptol

Fonte: Oliveira (2014); Costa (2015).

Observa-se na Figura 18, a estrutura química do Estragol e Eucaliptol, constituintes majoritários encontrados principalmente nas análises químicas de OEM

variam obtendo resultados diversos, devido provavelmente ao seu polimorfismo, o qual por sua vez é causado pela hibridização inter e intra-específica (GRAYER et al., 1996; PATON, PUTIEVSKY, 1996).

Consoante a este fato, o teor de óleo essencial na planta medicinal tem como influência no ciclo vegetativo, os fatores ambientais (altitude e longitude), climáticos (temperatura, fotoperíodo, umidade, ventos, precipitação), e as características do solo, do manejo do plantio, do beneficiamento e do método de extração (BOTREL et al., 2010).

De acordo com Kasali et al., (2004) pesquisando a composição de óleos voláteis de novos quimiotipos de manjeriço na Nigéria, utilizando o método de hidrodestilação para a extração do óleo e a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas para a identificação dos componentes, observaram que, entre os vinte e quatro componentes, representando 95% do total do óleo, o metil chavicol (60,30%), o linalol (10,80%) e o (Z) –metil cinamato (6,30%) foram identificados como os constituintes majoritários.

Os resultados se assemelham aos alcançados por diversas pesquisas nas quais à presença do metil chavicol, ou seja, o estragol é o componente químico majoritário, corroborando com o presente estudo que obteve o estragol (59,76 %) do OEM. Contudo, o linalol que se evidencia majoritário em alguns outros trabalhos científicos, sendo que neste estudo o mesmo alinhou-se em 3º ordem percentual com o valor de 5,52%.

6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais das plantas medicinais selecionadas na concentração de até 100 µg/mL tiveram maior capacidade de inibir as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis (ATCC 12011) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), mas houve diferenças entre as mais sensíveis.

O óleo essencial das folhas do capim-limão revelou a maior atividade antimicrobiana perante todas as bactérias selecionadas. Além disso, as bactérias Gram-positivas avaliadas nesta pesquisa foram mais susceptíveis ao poder inibidor dos óleos essenciais. Das bactérias testadas, à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) mostrou os halos de inibição mais significativos. No que se diz respeito às bactérias Gram-negativas, à *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) foi a que mostrou maior resistência.

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais supostamente está relacionada à lipofilicidade encontrada nos terpenos. Assim nesta pesquisa, teve como resultado identificar e quantificar o percentual e composição química de seus respectivos componentes majoritários nos óleos essenciais selecionados: OEA com 12 compostos, 91,76%, a cânfora (27,51%); OECL com 8 compostos, 93,53%, o geraniol (43,96%); OECL com 4 compostos, 99,17%, eugenol (75,85%) e OEM com 10 compostos, 94,17% do estragol (59,76%), que devido à presença e atuação dos compostos químicos promovem distintas ações farmacológicas. Além disso, provavelmente possuem efeito antibacteriano.

Foi possível perceber a presença de dois constituintes químicos por análises de CG/EM, nas amostras de OEA, OECL, OEM, encontrou-se o β-Cariofileno e o linalol presente no OEA, OECL e OEM.

O percentual mássico e a qualificação das amostras dos de óleos essenciais de OEA, OECL, OECL, OEE e OEM obtidos por análises de CG/EM, levaram em consideração àqueles compostos com percentual de área superior a 0,2%, demonstrou ainda presença de monoterpenos na maioria das espécies selecionadas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A continuidade desta pesquisa deverá ser realizada com o emprego de outras formas de obtenção dos óleos essenciais e outras concentrações utilizando microrganismos oriundos de um leque mais amplo e deverá fornecer resultados que indiquem de maneira mais precisa a real aplicabilidade desses. Portanto, propõem-se as seguintes investigações:

1. Reproduzir as análises executadas nesta tese com o objetivo de avaliar o desempenho satisfatório alcançado pelas plantas medicinais, com as demais da região.
2. Avaliar o efeito antibacteriano nas condições climáticas, de armazenagem e o transporte de óleos essenciais oriundos de plantas medicinais de diferentes regiões.
3. Estudar a vida de prateleira de alimentos, em termos da MIC de óleos essenciais, e das plantas medicinais.
4. Procurar diferentes locais, e mesmas plantas medicinais testadas nesta pesquisa para avaliar os métodos de secagem.
5. Utilizar amostras obtidas em feiras e/ou mercados para avaliar seus potenciais antibacterianos *in situ*.

REFERÊNCIAS

- ABEGAZ, B.; YOHANNES, P. G. **Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citratus* Stapf.** *Journal of Natural Products*, Columbus, v.46, n. 3, p. 424-426, 1983.
- ACEVEDO, D.; NAVARRO, M.; MONROY, L. Composition química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). *Información tecnológica*, 24 (4), 2013, p. 43-48.
- AGRA, M. F; FRANÇA, P. F; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140, 2007.
- AFFONSO, C. R. G. et al. Effects of the essential oil from fruits of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) on reproductive functions in male rats. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, n. 1, p. 180-185, 2012.
- AKISUE, G. et al. Padronização da droga e do extrato fluido de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Lecta Revista de Farmácia e Biologia*, v. 14, n. 2, p. 109-119, 1996.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medical Ethnobiology and Ethnopharmacology in Latin America. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- ALI T. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of essential oil of *Nepeta pogonosperma* Jamzad et Assadi in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 20, p. 48, 2012.
- ALMEIDA, Mara Zélia de. **Plantas medicinais**. 3.ed. Salvador: EDUFBA, 2011. 221 P.
- ALZOREKY, N.S; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Inter. J. Food Microbiology*, 80(3): 223, 2003.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Atlas Botânica Brasileira**. São Paulo, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2012.

ARAÚJO, E. F.; BARBOSA, C. M.; QUEIROGA, E. S.; ALVES, S. S. Propriedade intelectual: proteção e gestão estratégica do conhecimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 1-10, 2010.

ARGENTA, SC. **Plantas medicinais: cultura popular versus ciência**. Vivências. Vol.7, N.12: p.51-60, Maio/2011.

ATAÍDE, R. A.; OLIVEIRA, R. A. G.; ARAÚJO, E. C.; VASCONCELOS, E. M. R. Uso de remédios caseiros por mulheres do Programa Saúde da Família. **Revista de Enfermagem da UFPE online**. v. 1, n. 2, p. 97-103. 2007.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M., LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotech. Adv.*, v.33, p.1582-1614, 2015.

ATTI-SANTOS, A.C.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M.R.; ROSSATO, M.; ATTI-SERAFONI, L. Estudo da qualidade de amostras comerciais de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, n.2, p.44-47, 2004.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Cosmetics Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446–475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**. Vitória: Edufes, 2008. 624p.

BETTAIEB, I.; ZAKHAMA, N.; AIDI WANNES, W.; KCHOUK, M.E.; MARZOUK, B. Water deficit effects on *Salvia officinalis* fatty acids and essential oil composition. **Scientia Horticulturae**, Oxford, n. 120, p. 271-275, 2009.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas. **Uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 332 P.

BEZERRA, A. M. E. et. al. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 26-29, jan./mar. 2008.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 829 p, 2002.

BOAVENTURA A. O. et al. Avaliação das atividades antifúngicas e antibacterianas do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), **Anais do CNPq**, Belo Horizonte MG, 20 jun. 2006.

BOIX, Y. F. et al. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BONA, F.G.S.P.; FRUET, T.K.; JORGE, T.C.M.; MOURA, A.C. Comparacao de metodos para avaliacao da atividade antimicrobiana e determinacao da concentracao inibitoria minima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanolicos. **Arq. Inst. Biol.**, Sao Paulo, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; Araújo, A. C. C.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C.; FERRI, P. H.; COSTA, D. P. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marrubioides* EPL. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 33-37, 2010.

BOUKHATEM MN, KAMELI A, FERHAT MA, SAIDI F, MEKARNIA M. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. *Libyan Journal of Medicine*. 2013.

BRAZ FILHO, Raimundo. Contribuição da Fitoquímica Para o Desenvolvimento de um País Emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

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

CABRAL, C.; POÇAS, J.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; CRUZ, M.T.; SALGUEIRO, L. *Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil. *Ind. Crop. Prod.*, v.65, p.56-61, 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v 33, p. 179-189, 2000.

CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1914-1920, 2002.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

CARVALHO JUNIOR, R. N. Obtenção de extrato de alecrim (Rosmarinus officinalis) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo. 2004. **TESE** (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHAGAS, J. H. et al. Produção de biomassa e teor de óleo essencial em função da idade e época de colheita em plantas de hortelã-japonesa. *Acta Scientiarum*. Maringá, v. 33, n. 2, p. 327-334, 2011.

CIMANGA K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79 n.2, p.213-20, 2002.

CORRÊA, R.M., PINTO, J.E.B.P., REIS, E.S., COSTA, L.C.B., ALVES, P.B., NICULAN, E.S., BRANT, R.S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2010,v.12, p.80–89.

COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; PEDRO, A. S.; DAVID, J. P. DE L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R. DOS; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(4): 502-505, ago.set. 2010

COSTA, Vinicius Vieira. Transformações de compostos terpênicos via reações catalíticas: valorização de matéria-prima de origem natural [manuscrito]. 2015.

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

CUNHA, A. P., et al.. Fármacos aromáticos (Plantas aromáticas e óleos essenciais). In: CUNHA, A. P. d. (ed.) **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2ª ed. Lisboa Fundação Caloust Gulbenkian, 2009, p.339 - 401.

CUNHA, A. P.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Fármacos aromáticos (plantas aromáticas e óleos essenciais). In: CUNHA, A. P. In: **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 341- 412.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O.; NOGUEIRA, M. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2012.

DAWIDOWICZ, A.L.; RADO, E.; WIANOWSKA, D. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, v. 76, n. 4, p. 878 -884, 2008.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P.; FRIZZO, C. D.; ATTI-SERAFINI, L.; DUGO, P. Rosmarinus officinalis L. (Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay. **Journal of Essential Oils Research**, v. 11, n. 1, p. 27-30, 1999.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella choleraesuis* Typhi by disrupting the cellular membrane. **J. Ethnopharmacology.**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2a ed. John Wiley & Sons Ltd, p. 212 e 168, 2002.

DIARRA, M. S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy**, v. five, p. 282, 2014.

DONSI, F. *et al.* Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, fev. 2014, p. 212-220.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-316, 2000.

DUARTE, A.; LUÍS, Â.; OLEASTRO, M.; DOMINGUES, F.C. Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food Control*, v.61, p.115-122, 2016,

EGWAIKHIDE, P., OKENIYI, S., GIMBA, C. (2009). Screening for Anti-Microbial Activity and Phytochemical Constituents of Some Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(12): 1088-1091.

EL GENDY, A.D., EL GOHARY, A.E., OMER, A.E., HENDAWY, S.F., HUSSEIN, M.S., PETROVA, V., STANCHEVA, I. Effect of nitrogen and potassium fertilizer on herbage and oil yield of chervil plant (*Anthriscus cerefolium* L.). **Industrial Crops and Products**. 2015, v.69, p.167–174.

ELLER, S.C.W.S.; FEITOSA, V.A.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATAO, R. M.R. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. **Revista Ciênc Farm Básica Apl.**, 36(1):131-136 ISSN 1808-4532, 2015.

ENGELBERTH, J. (2010). Secondary Metabolites and Plant Defense. In: Taiz, L. & Zeiger, E. (eds.) *Plant Physiology*. 5ª ed. E.U.A.: Sinauer Associates, Inc. pp.369-400

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim CEPPA**, v. 25, n. 2, p. 193-206, 2007.

.ESTANISLAU AA, BARROS FAZ, PEÑA AP, SANTOS SC, FERRI PH, PAULA JR 2001. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Rev Bras Farmacogn** 11: 95-98.

FENNELL, C. W., LIGHT, M. E., SPARG, S. G., STAFFORD, G. I., VAN STADEN, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. **J Ethnopharmacol** 95: 113-121. 2004.

FERNANDES JUNIOR, Ary. **Produtos antimicrobianos naturais**: potencial de uso na terapêutica das doenças infecciosas e como aditivos em alimentos. Botucatu: [s.n.], 2012.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA JUNIOR, W. F.; MAGALHÃES, J.C. Phototherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.290-298, 2014.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008, 502p

FIRMO, WCA. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **CFR-Code of federal regulations title 21: Part 182-Substances Generally Recognized as Safe**, 2013.

FREITAS AVL, COELHO MFB, AZEVEDO RAB, MAIA SSS. Os raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. *R. Bras. Bioci.* 2012; 10(2):147-156.

GAIO, I. Atividade antimicrobiana e antioxidante in vitro e em salame tipo italiano do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum Basilicum L.*). 2008. 141p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões URI, Erechim, 2008.

GONCALVES, D.M.; ARAUJO, J.H.B.; FRANCISCO, M.S.; COELHO, M.A.; FRANCO, J.M. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.197-202, 2011.

GONÇALVES, F.A.; NETO, M.A.; BEZERRA, J.N.S.; MACRAE, A.; SOUZA, O.V.; FONTELES-FILHO, A.A.; VIEIRA, R.H.S.F. Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.50, n.1, p.11-15, jan./fev, 2008.

GRAY JR, Kite GC, Goldstone FJ, Bryan SE, Paton A, Putievsky E. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v.4, p. 10033-1039, 1996

GUNALAN, G.; SARASWATHY, A.; KRISHNAMURTHY, V. Antimicrobial activity of medicinal plant *Bauhinia variegata* Linn. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.1, n.4, p.400-408, oct./dec., 2011.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., 2001, p. 586-587

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. **Food Chem** 108: 986-995. 2008.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P. S. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1070-1078, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: 1985. 553p.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2000**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

JARRAR, N.; ABU-HIJLEH, A.; ADWAN, K. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L., alone and in combination with cefuroxime, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, China, v. 3, n. 2, p. 121-123, 2010.

JOSÉ, J.V. et al. ANÁLISE DE HORÁRIO DE COLHEITAS E PARTES DA PLANTA PARA EXTRAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE MANJERICÃO. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v. 8, p. 55-70, Jan 2015.

KASALI, A. A.; EKUNDA, Y. O. O.; PAUL, C.; KOENIG, W.; ESHILOKUN, A. O.; YADUA, P. 2004. Essential oil of *Lantana câmara* L. var. aculeate from Nigeria. **J Essent Oil Res** 16 : 588-593.

KLANČNIK A, PISKERNIK S, JERŠEK B, MOŽINA SS. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **J Microbiol Methods** 81: 121–126. 2010.

KLUCZYNIK, C.E.N.; SOUZA, J.H.; PALMEIRA, J.D.; FERREIRA, S.B.; ANTUNES, R.M.P.; ARRUDA, T.A.; MORAIS, M.R.; CATÃO, R.M.R. Perfil de sensibilidade de *Salmonella choleraesuis* sp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais. **RBAC**, v.42, n., p.141-144, 2010.

KOLASANI, A., XU, H., MILLIKAN, M. (2011). Evaluation of Mineral Content of Chinese Medicinal Herbs Used to Improve Kidney Function With Chemometrics. *Food Chemistry*. 127(4): 1465-1471.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A. Review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p.13-39, 2012.

LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais, **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 7, p. 251-258, 2003.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2008.

MATASYOH, J. C.; WAGARA I. N.; NAKAVUMA J. L.; KIBURAI, A. M. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus* species. *African Journal of Food Science*. 5, 138-142, 2011.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M. ; VIEIRA, A.B.R. ; MENDONCA, L.C.V. ; SILVA, R.M.F. ; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanolicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 32(1):121-125 ISSN 1808-4532, 2011.

MILLEZI, A.F.; CAIXETA, D.S.; ROSSONI, D.F.; CARDOSO, M.G.; PICCOLI, R.H. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n.1, p. 167-172, 2012.

MIRANDA, V. C.; LEAL, T. C. A. B.; PEREIRA D.; MIRANDA, V. C.; SANTOS, V. M. Evaluation of the effect of time of cutting on the content of the essential oil of the holy grass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Journal Biotec. Biodiversity**, v.4, n. 1, p. 55-59, Feb 2013.

MOSCA, V. P.; LOIOLA, M. I. B. Uso popular de plantas medicinais no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4, p. 225-234, 2009.

MOSCHONAS, G.; GEORNARAS, I.; STOPFORTH, J.D.; WOERNER, D.R.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N. Effect of product dimensions and surface browning

method on salmonella contamination in frozen, surface-browned, breaded chicken products treated with antimicrobials. *J. Food Sci.*, v.80, p.2815-2821, 2015.

NAHA. (2014). **Exploring Aromatherapie**. Disponível em: <http://www.naha.org/>
Acesso em: 30 jul. 2016.

NAIK, M.I.; FOMDA, B.A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bactérias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 1, n.1, p 535-538, 2010.

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

NASCIMENTO, I. B.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; MATTOS, S. H.; NAGÃO, E. O. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo, **Revista Ciência Agronômica**, 34 (2), p. 169-172, 2003.

NAVARRETE, A.; WALLRAF, S.; MATO, R. B.; COCERO, M. J. **Improvement of Essential Oil Steam Distillation by Microwave Pretreatment**. *I&EC Research*, v. 50, p. 4667-4671, 2011.

OLIVEIRA, A. R. M. F. et al. Influência da idade da planta na produção de óleo essencial de alevante. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 2, p. 241-245, mar./abr. 2012.

OLIVEIRA, R. A., MOREIRA, I. S., OLIVEIRA, F. F. Linalool and methyl chavicol present basil (*Ocimum sp.*) cultivated in Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinas**, Campinas, v.15, n.2, p.309-311, 2013.

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. A.; OGUNLANA, G.O. Antibacterial Constituents in the essential oil of *Cymbopogon Citratus* (D.C.) **Stapf. Journal of Ethnopharmacology Lausanne**, v.12, n.3, p.279-286, 1984.

PALMA J. S. Ações dos profissionais de saúde da Atenção Básica em relação às plantas medicinais [**Dissertação**]. Pelotas: Faculdade de Enfermagem/UFPel; 2011.

PARIKH, J. K.; DESAI, M. A. Hydrodistillation of essencial oil from *Cymbopogon flexuosus*. **International Journal of Food Engineering**, 7(1), 2011, p. 1-9.

PATON, A.; PUTIEVSKY, E. **Taxonomic problems and cytotoxic relationships between and within varieties of *Ocimum basilicum* and related species (Labiatae).** Kew Bull, v. 51, p. 509-524, 1996.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n.4, p.146-152, 2012.

PEREIRA, C.A.M. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(3): p.624- 632, 2007.

PICHERSKY, E.; GANG, D. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science Perspectives* 5, pp.439- 445.

PINTO, D.A.I; MANTOVANI, E.C.I; MELO, E. De C.I; SEDIYAMA, G.C.I; VIEIRA, G.H.S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Rev. bras. plantas med.** vol.16 no.1 Botucatu Jan./Mar. 2014

PINTO, J. E. B. P. et al. **Plantas Mediciniais.** Lavras: PROEX/UFLA, 2000. 74 P.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 P.

PRINS, C. L.; FREITAS, S. P.; CAMPOSTRINI, E.; CRAVINA, G. A.; REIS, P. O. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 03, p. 416-421, 2008.

PROBST, I. S. et al. Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases.** v. 17, p. 159-167, 2011.

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

REIS, T.V. Potencialidade das folhas do Craveiro-da Índia cultivados no Sul da Bahia para extração de óleos essenciais. In: **XLVI Congresso Brasileiro de Química, Associação Brasileira de Química**, Salvador, 25 a 29 de setembro de 2008.

RIO BRANCO, Washington. Política pública, território e proteção ambiental: o processo de palafitalização da laguna da Jansen, em São Luís-MA. In: **PORTO, Iris Maria Ribeiro e CASTRO, Cláudio Eduardo de (org.)**. Abordagens geográficas das multiplicidades dos espaços maranhenses. São Luís: EDUEMA, 2011.

ROCHA, F. A. G. et al. Comércio informal de plantas medicinais: características da comercialização, crenças no uso e perfil socioeconômico dos feirantes de Lagoa Nova, RN. In: CONNEPI – Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação, 7., 2012, Palmas. **Anais** Ciência Tecnologia e inovação: ações sustentáveis para o desenvolvimento regional. Palmas: Editora do IFTO. ISBN 978-85-62830-10-5 Disponível em: < <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/view/1344>>. Acesso em: 17 mai. 2016.

RODRIGUES, I.M.C.; SOUZA FILHO, A.P.S.; FERREIRA, F.A. Estudo Fitoquímico de Senna Alta por duas Metodologias. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 3, 2009.

Rodrigues, D.S., Camargo, M.S., Nomura, E.S., Garcia, V.A., Correa, J.N., Vidal, T.C.M. Influência da adubação com nitrogênio e fósforo na produção de Jambu, *Acmella oleracea* (L) R.K. Jansen. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 2014, v.16, n.1, p. 71–76.

SACCHETTI, G. *et al.* Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n.3, p. 621-632, 2004.

SANTOS, A.S. ALVES, S.M.; FIGUEIRÊDO, F, J. ROCHA NETO, O.G. Descrição de sistema e do método de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Comunicado técnico 99- **Ministério da Agricultura pecuária e abastecimento – Belém PA**, Nov. 2004.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochiliocarpos* (Gomes) Barnaby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.215-219. 2007.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v.68, n.04, p.790-795, 2005.

SECRETARIA DE SAÚDE. **Política Municipal de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde**. Guarulhos, 2014.

SEMIKOLENOV, V. A., ILYNA, I. I. & MAKSIMOVSKAYA, R. I. 2003. Linalool to geraniol/nerol isomerization catalyzed by (RO)₃VO complexes: studies of kinetics and mechanism. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, 204–205, 201-210.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Medicinais: In: **J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiflamatório. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2007, 480 P.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, 2008. p. 618-626.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Ed UFRGS, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102 p., 2004.

SIMÕES, S. C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/UFSC, 2010. 1104 P.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: **SIMÕES C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.D.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cap. 18, p. 387-415, 2000.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G.-J.E. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. **Italian Journal of Food Science**. v.13, n.1, p.65-75, 2001.

SOUSA DP. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules*. n. 16, p. 2233-2252, 2011.

SOUZA, S. M., et al. (2010). **Óleos essenciais**: aspetos económicos e sustentáveis. *Enciclopédia Biosfera*, 6, pp.1-11.

STERN, M. **Conheça a Fitoterapia**. 2013. Disponível em: <http://www.saudenainternet.com.br/portal_saude/conheca-a-fitoterapia.php>. Acesso em: 11 jul. 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TANGERINO, L. M. B. **Estudo das propriedades antimicrobianas de copolímeros derivados do eugenol**. Universidade Federal de Itajubá, 2006
Dissertação (Mestrado) ± Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, 2006.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedades antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, jul. set. 2009.

VAISHNAV, Preeti; DEMAIN, Arnold L. Unexpected applications of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 223 – 229, 2010.

VLASE, L.; BENEDEC, D.; HANGANU, D.; DAMIAN, G.; CSILLAG, I.; SEVASTRE B.; MOT, A.C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; TILEA, I. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, v.19, p.5490-5507, 2014.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

WAGNER, Hildebert; WISENAUER, Markus. **Fitoterapia – Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2ed. São Paulo: Pharma books, 2006.

YU, F.; DE LUCA, V. Transport of Monoterpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus roseus*. In: GEISLER, M. (org.), Springer. **Plant ABC Transporters**, v.22, p. 63-75. New York. 2014.

ZAGO, J.A.A., USHIMARU, P.I., BARBOSA, L.N., FERNANDES JR, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Rev. Bras. Pharmacogn**, v.19, p.828-33. 2009.

ZANDI-SOHANI, N.; RAMEZANI, L. Evaluation of five essential oils as botanical acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestanii* Ugarov and *Nikolskii*. *Int. Biodeter. Biodegr.*, v.98, p.101-106, 2015

ZION RESEARCH ANALYSIS.

Global essential oil market volume share, by product, 2014 – 2020. 30 Sept. 2016. Available in: <<http://www.newsmaker.com.au/news/120978/global-essential-oil-market-volume-share-by-product-2014-2020#.WCH5hNlrK1s>>. Access in: 8 Oct. 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Fórmulas dos Cálculos estatísticos da ANOVA.

FV	SQ	GL	QM	F
Tratamentos	SQ(TRAT)	K-1	QM(TRAT)	$F=QM(TRAT)/QM(RES)$
Blocos	SQ(BLOCO)	B-1	QM(BLOCO)	$F=QM(B)/QM(RES)$
Resíduos	SQ(ERRO)	N-K- B+1	QM(ERRO)	
Total	SQ(TOTAL)	N-1	QM(TOTAL)	

Legenda: FV – Fonte de Variação; SQ- Soma de Quadrado; GL- Grau de Liberdade; F- Valor calculado.

APÊNDICE B – Demais fórmulas estatísticas utilizadas nesta pesquisa.

$C = (y)^2/N$	$C = (491,14)^2/30$	8.040,62
SQ total= $(y^2) - C$	SQ total= 8.907, 86 - 8 040, 62	1162
SQ trat= $T^2/ br - C$	SQ trat= $(106,03^2 + 111,37^2 + 108,2^2 + 62,36^2 + 103,18^2/ 6) - 8 040,62$	8 314 63 - 8 040,62 =274
SQ bloco= $(B^2/ kr) - C$	SQ bloco= $(286,35^2 + 204,79^2) / 15$	8 262, 35 - 8040,62= 222
SQ erro= SQ total- SQ trat - SQ bloco	SQ erro= 1162 -274 - 222	666
SQ interação = $T^2 - C - SQ total - SQ bloco$	SQ interação = 25790,34 – 8. 040, 62 – 1162 - 222	60,16

Legenda: C – Correção; y- variáveis; N- numero total de elementos; T- Tratamentos; B- Bloco; r- Repetição; k-tratamento; b- bloco.

APÊNDICE C – Demais fórmulas estatísticas utilizadas nesta pesquisa Cálculos estatísticos aplicados na ANOVA.

Microrganismos		Halo de inibição (mm)					Total
		OEA	OECL	OECI	OEE	OEM	
Gram-positivas	<i>S. aureus</i>	27,33	31,33	22,67	17,67	19,67	286,35
	<i>B. cereus</i>	25,33	24,03	17,83	8,14	21,33	
	<i>E. faecalis</i>	14,01	12,03	17,67	7,98	19,33	
		66,67	67,39	58,17	33,79	60,33	
Gram-negativas	<i>E. coli</i>	13,01	16,33	21,33	9,33	22,33	204,79
	<i>S. enterica</i>	15,02	14,32	21,04	9,36	9,34	
	<i>P. aeruginosa</i>	11,33	13,33	7,66	9,88	11,18	
		39,36	43,98	50,03	28,57	42,85	
Total		172,7	178,76	166,37	96,15	163,51	777,49

Fonte: Elaborado pelo autor adaptado pelo programa de estatística

APÊNDICE D – Continuação dos cálculos estatísticos – ANOVA.

FV	SQ	GL	QM	F cal	F tab
Tratamentos	274	4	68,5	2,674174174	2,74
Blocos	222	1	222	8,666666667	4,24
Interação	60,16	4	15,04	0,587147147	2,74
Resíduos	666	26	25,61538462	-	-
Total	1162	29	-	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor adaptado pelo programa de estatística

ANEXOS

ANEXO A – Antibióticos comerciais da série Gram-positiva.

SÉRIE GRAM-POSITIVA		HALOS DE INIBIÇÃO (mm)		
SIGLAS	ANTIBIÓTICOS	RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
CLI	Clindamicina	≤ 14	15-20	≥ 21
CLO	Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
CIP	Ciprofloxacina	≤ 15	16-20	≥ 21
ERI	Eritromicina	≤ 13	14-17	≥ 18
GEN	Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
OXA	Oxacilina	≤ 10	11-12	≥ 13
TET	Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
VAN	Vancomicina	≤ 09	10-11	≥ 12

Fonte: Elaborado pelo autor

ANEXO B – Antibióticos comerciais da série Gram-negativas.

SÉRIE GRAM-NEGATIVA		HALOS DE INIBIÇÃO (mm)		
SIGLAS	ANTIBIÓTICOS	RESISTENTE	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL
AMI	Amicacina	≤ 14	15-16	≥ 17
AMP	Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
CFO	Cefoxitina	≤ 14	15-17	≥ 18
CIP	Ciprofloxacina	≤ 15	16-20	≥ 21
CLO	Clorafenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
NET	Netilmicina	≤ 12	13-14	≥ 15
SUT	Sulfazotrim	≤ 12	13-17	≥ 18
TET	Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19

Fonte: Elaborado pelo autor

ANEXO C – Distribuição Teste F (Fisher-Snedecor) 5% de probabilidade.

GL													V1
V2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.0	243.9	244.7
2	18.513	19.000	19.164	19.247	19.296	19.329	19.353	19.371	19.385	19.396	19.405	19.412	19.419
3	10.128	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.785	8.763	8.745	8.729
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.936	5.912	5.891
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.704	4.678	4.655
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.027	4.000	3.976
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.603	3.575	3.550
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.688	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.313	3.284	3.259
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.102	3.073	3.048
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.943	2.913	2.887
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.818	2.788	2.761
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.717	2.687	2.660
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.635	2.604	2.577
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.565	2.534	2.507
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.507	2.475	2.448
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.456	2.425	2.397
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.413	2.381	2.353
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.374	2.342	2.314

Fonte: <https://brainly.com.br/tarefa/3736841>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, de de .

Assinatura do autor