

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA**

MAYARA GOBETTI FERNANDES DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA IN VITRO
DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS
DE MANJERONA (*Origanum majorana* L.) E
MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2011

MAYARA GOBETTI FERNANDES DA SILVA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE ÓLEOS
ESSENCIAIS E EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS DE MANJERONA (*Origanum
majorana* L.) E MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), *Campus* Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.
Orientador: Solange Teresinha Carpes
Co-orientador: Sirlei Dias Teixeira

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS DE MANJERONA (*Origanum majorana* L.) E MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)** foi considerada APROVADA de acordo com a ata da banca examinadora N° 028B2 de 2011.

Fizeram parte da banca examinadora:

Solange Teresinha Carpes

Sirlei Dias Teixeira

Elídia Aparecida Vetter Ferri

Dedico este trabalho a minha mãe Denize e a minha irmã Suélen,
razões da minha existência e formas de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, que se esforçou tanto para que eu tivesse boas condições de estudo, que me apoiaram dando-me forças desde o início e entenderam minha ausência nessa etapa de meu trabalho.

Agradeço aos amigos e professores por colaborarem direta ou indiretamente na realização deste trabalho de conclusão de curso, aos laboratórios de Química da UTFPR, a Edenes Schroll Loss e as estagiárias deste.

A minha orientadora, a professora Dr^a. Solange Teresinha Carpes.

A minha co-orientadora, a professora Dr^a. Sirlei Dias Teixeira.

Enfim, a todos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito.”

Fernando Pessoa

RESUMO

SILVA, Mayara G. F. da. Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjericão (*Ocimum basilicum* L.). 2011. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e a manjerona (*Origanum majorana* L.) são considerados uma boa fonte nutricional com benefícios para a saúde, principalmente pela presença de compostos fenólicos com atividade antioxidante. Neste estudo, foi determinado o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e atividade antioxidante e antibacteriana de extratos hidroalcóolicos e óleos essenciais destas duas ervas aromáticas. A atividade antioxidante dos extratos hidroalcóolicos e óleos essenciais foi determinada e comparada à de antioxidantes comerciais BHT (butil-hidroxi-tolueno), BHA (butil-hidroxi-anisol) e α -tocoferol pelo método de sequestro do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrihidrazil). Os valores obtidos para os compostos fenólicos e flavonóides totais para o manjericão (*Ocimum basilicum* L.) foram de 63,499 mg EAG/g (EAG: equivalente em ácido gálico) e 14,879 mg EQ/g (EQ: equivalente em quercetina), respectivamente, e para a manjerona (*Origanum majorana* L.) de 41,244 mg EAG/g e 7,363 mg EQ/g, respectivamente. Foram encontradas altas atividades de seqüestro para o radical livre DPPH•, com EC₅₀ (Concentração da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•) de 363,992 μ g/mL para o extrato hidroalcóolico de manjericão (*Ocimum basilicum* L.), 472,557 μ g/mL para o extrato hidroalcóolico de manjerona (*Origanum majorana* L.), 0,952 μ L/mL para o óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum* L.), 1,783 μ L/mL para o óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana* L.) e 114,665 μ g/mL, 72,250 μ g/mL e 61,220 μ g/mL para as substâncias de referência BHT, BHA e α -tocoferol, respectivamente. A atividade antioxidante do extrato hidroalcóolico de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) foi de 88,74% pelo método do DPPH•, para o extrato hidroalcóolico de manjerona (*Origanum majorana* L.) foi de 86,90%, para o óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) foi de 91,20%, para o óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana* L.) foi de 81,15% e para as substâncias de referência BHT, BHA e α -tocoferol de 52,37%, 73,69% e 90,52%, respectivamente. Foi observado que tanto o extrato hidroalcóolico quanto o óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum* L.), apresentaram uma alta capacidade de sequestro de radical livre. A atividade antioxidante dos antioxidantes utilizados na indústria alimentícia (BHA, BHT e α -tocoferol) foi superior à dos extratos hidroalcóolicos de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.), pois estes foram analisados puros. Embora os extratos hidroalcóolicos e óleos essenciais de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.) analisados tenham apresentado um alto teor de compostos fenólicos com atividade antioxidante,

somente os óleos essenciais destas ervas demonstraram uma atividade antibacteriana não muito significativa pelos métodos utilizados.

Palavras-chave: *Ocimum basilicum* L.; *Origanum majorana* L.; compostos fenólicos totais; flavonóides totais; DPPH; CIM; CBM.

ABSTRACT

SILVA, Mayara G. F. da. Antimicrobial and antioxidant activity in vitro of essential oils and hydroalcoholic extracts of marjoram (*Origanum majorana* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.). 2011. 70 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Química – Bacharelado em Química Industrial/Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

Basil (*Ocimum basilicum* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) are considered a good source of nutrition with health benefits, mainly by the presence of phenolic compounds with antioxidant activity. In this study we determined the content of total phenolics, total flavonoids and antioxidant and antibacterial activity of hydroalcoholic extract and essential oils of these two herbs. The antioxidant activity of hydroalcoholic extract and essential oils was determined and compared to commercial antioxidants BHT (butylated hydroxy-toluene), BHA (butylated hydroxy-anisole) and α -tocopherol using the kidnapping of free radical DPPH• (2, 2-diphenyl-1-picrihidrazil) and whitening system β -carotene/acid linoleic. The values obtained for total phenolics and flavonoids for basil (*Ocimum basilicum* L.) were 63,499 EAG mg/g (EAG: gallic acid equivalent) and 14,879 EQ mg/g (EQ: quercetin equivalent), respectively, and marjoram (*Origanum majorana* L.) 41,244 EAG mg/g and 7,363 mg EQ/g, respectively. We found higher activities of kidnapping for the free radical DPPH• with EC₅₀ (concentration of antioxidant needed to reduce by 50% the initial concentration of DPPH•) of 363,992 μ g/mL for the hydroalcoholic extract of basil (*Ocimum basilicum* L.), 472,557 μ g/mL for the hydroalcoholic extract of marjoram (*Origanum majorana* L.), 0,952 μ L/mL for the essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L.), 1,783 μ L/mL for the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) and 114,665 μ g/mL, 72,250 μ g/mL and 61,220 μ g/mL for the reference substances BHT, BHA and α -tocopherol, respectively. The antioxidant activity of hydroalcoholic extract of basil (*Ocimum basilicum* L.) was 88,74% of DPPH• method for the hydroalcoholic extract of marjoram (*Origanum majorana* L.) was 86,90% for the essential oil basil (*Ocimum basilicum* L.) was 91,20% for the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) was 81,15% and for the reference substances BHT, BHA and α -tocopherol of 52,37% , 73,69% and 90,52%, respectively. It was observed that both the hydroalcoholic extract and essential oil of basil (*Ocimum basilicum* L.), showed a high capacity for sequestering free radical. The antioxidant activity of antioxidants used in food industry (BHA, BHT and α -tocopherol) was higher than the hydroalcoholic extract of basil (*Ocimum basilicum* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.), because these were considered pure. Although the hydroalcoholic extract and essential oils of basil (*Ocimum basilicum* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) analyzed have presented a high content of phenolic compounds with antioxidant activity, only the essential oils of these herbs showed a non significant antibacterial activity by methods used.

Keywords: *Ocimum basilicum* L.; *Origanum majorana* L.; total phenolic compounds; total flavonoids; DPPH; MIC; MBC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos, (a) BHA, (b) BHT, (c) PG e (d) TBHQ.....	22
Figura 2 – Estrutura Química do α -Tocoterol.	22
Figura 3 – Esquema de sequestro de radicais livres (R•) por flavonóides (FL).....	28
Figura 4 – Sítios de ligações de metais em flavonóides.....	29
Figura 5 – Estrutura química do fenol.....	29
Figura 6 – Estrutura básica dos flavonóides onde as diferentes classes ocorrem de acordo com as substituições de Rn.....	30
Figura 7 – Estrutura básica dos ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico (a) e cinâmico (b) onde os diferentes compostos ocorrem de acordo com as substituições de Rn.....	30
Figura 8 – Reação do radical livre DPPH• com uma molécula antioxidante.	32
Figura 9 – Diagrama simplificado da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	34
Figura 10 – Ervas aromáticas coletadas para as análises, (a) manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.) e (b) manjericão (<i>Ocimum basilicum</i> L.).....	41
Figura 11 – Ervas aromáticas sendo secas em estufa, (a) manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.) e (b) manjericão (<i>Ocimum basilicum</i> L.).....	41
Figura 12 – Moinho de facas utilizado para moer as ervas aromáticas.....	42
Figura 13 – Aspecto das ervas trituradas utilizadas nos ensaios, (a) manjerona e (b) manjericão.....	42
Figura 14 – Extração das ervas aromáticas em banho-maria, (a) manjericão e (b) manjerona.	42
Figura 15 – EEEA utilizados para as análises, (a) manjericão e (b) manjerona.....	42
Figura 16 – Hidrodestilação das ervas aromáticas.....	43
Figura 17 – OEEA utilizados nas análises, (a) manjericão e (b) manjerona.....	43
Figura 18 – Compostos fenólicos e flavonóides totais dos EEEA.	44
Figura 19 – Curva padrão de ácido gálico.....	45
Figura 20 – Gradiente de coloração da curva padrão de ácido gálico.	45
Figura 21 – Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução de cloreto de alumínio.....	46

Figura 22 – Curva padrão de quercetina.....	47
Figura 23 – Gradiente de coloração da curva padrão de quercetina.....	47
Figura 24 – Mudança de coloração da reação do radical DPPH com os compostos bioativos presente no óleo essencial de manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.), (a) no tempo de 0 minuto e (b) após 80 minutos de reação.	49
Figura 25 – Cinética de redução do DPPH (porcentagem de atividade antioxidante) dos EEEA, (a) manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) e (b) manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.).	50
Figura 26 – Cinética de redução do DPPH (porcentagem de atividade antioxidante) dos OEEA, (a) manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) e (b) manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.).	50
Figura 27 – Cinética de redução do DPPH (porcentagem de atividade antioxidante) das substâncias de referência, (a) α -tocoferol, (b) BHA e (c) BHT.....	51
Figura 28 – Cálculo do EC ₅₀ para os EEEA, (a) manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) e (b) manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.).	53
Figura 29 – Cálculo do EC ₅₀ para os OEEA, (a) manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.) e (b) manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.).	53
Figura 30 – Cálculo do EC ₅₀ para as substâncias de referência, (a) α -tocoferol, (b) BHA e (c) BHT.....	54
Figura 31 – Atividade antioxidante (EC ₅₀) dos EEEA, OEEA e substâncias de referência (BHT, BHA e α -tocoferol.....	55
Figura 32 - Bactérias reativadas utilizadas nas análises, (a) <i>Staphylococcus aureus</i> , (b) <i>Bacillus cereus</i> , (c) <i>Salmonella enteritidis</i> , (d) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
Figura 33 - Solução de soro fisiológico com bactérias.	57
Figura 34 - Teste de difusão em ágar com manjeriço, (a) <i>Salmonella enteritidis</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i> , onde 1, 2 e 3 são diluições do extrato, 2.133,33 ug/mL, 1.066,67 ug/mL e 533,33 ug/mL, respectivamente.	58
Figura 35 - Teste de difusão em ágar com manjerona, (a) <i>Salmonella enteritidis</i> e (b) <i>Staphylococcus aureus</i> , onde 1, 2 e 3 são diluições do extrato, 2.133,33 ug/mL, 1.066,67 ug/mL e 533,33 ug/mL, respectivamente.	59
Figura 36 - CIM dos extratos de manjeriço com <i>Salmonella enteritidis</i> , (a) inicialmente e (b) após 24 horas.	60
Figura 37 - CIM dos óleos essenciais de manjeriço com <i>Salmonella enteritidis</i> , (a) inicialmente e (b) após 24 horas.	60

Figura 38 - CBM dos óleos essenciais de manjerição com *Staphylococcus aureus*,
(a) inicialmente e (b) após 24 horas.61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teor dos compostos fenólicos e flavonóides totais dos EEEA.	44
Tabela 2 – EC ₅₀ dos EEEA, OEEA e substâncias de referência (BHA, BHT, α-tocoferol).	55
Tabela 3 – Porcentagem de atividade antioxidante das amostras analisadas pelo método do DPPH•.	56
Tabela 4 – Teste de Difusão em Ágar.	59

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

%AA	Atividade antioxidante (%)
ABTS	2,2-azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ATCC	American type culture collection
BHA	Butil-hidroxi-anisol (IUPAC: 2-terc-butil-4-metoxifenol)
BHI	Brain heart infuson (caldo utilizado nas análises antibacterianas)
BHT	Butil-hidroxi-tolueno (IUPAC: 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol)
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
DPPH•	2,2-difenil-1-picrihidrazil
EAG/g	Equivalente em ácido gálico por grama de erva
EC ₅₀	Concentração mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH•
EE	Extrato etanólico
EEEA	Extrato etanólico de ervas aromáticas
EQ/g	Equivalente em quercetina por grama de erva
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
OE	Óleo essencial
OEEA	Óleo essencial de ervas aromáticas
PG	Propil galato (IUPAC: propil 3,4,5-trihidroxibenzoato)
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona (IUPAC: 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol)
TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS	21
3.2 MANJERONA (<i>ORIGANUM MAJORANA L.</i>)	24
3.3 MANJERICÃO (<i>OCIMUM BASILICUM L.</i>)	25
3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	26
3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS	27
3.5.1 Métodos de Análise de Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>	31
3.6 ATIVIDADE ANTINICROBIANA DE PLANTAS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS	35
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS ERVAS AROMÁTICAS (EEEA)	35
4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ERVAS AROMÁTICAS POR HIDRODESTILAÇÃO	35
4.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	36
4.5 TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS	36
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH•	37
4.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EEEA E OEEA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR	38
4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM MEIO LÍQUIDO	39
4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 AMOSTRAS DE MANJERICÃO (<i>OCIMUM BASILICUM L.</i>) E MANJERONA (<i>ORIGANUM MAJORANA L.</i>)	41
5.2 EXTRATOS ETANÓLICOS DAS ERVAS AROMÁTICAS (EEEA)	42

5.3 ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ERVAS AROMÁTICAS (OEEA)	43
5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EEEA.....	43
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EEEA E OEEA.....	48
5.5.1 Cinética de reação do DPPH•: determinação do tempo de estabilização de reação	48
5.5.2 Atividade de seqüestro do radical livre DPPH•	52
5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EEEA E OEEA	56

1 INTRODUÇÃO

A busca por antioxidantes naturais para uso em produtos alimentícios e farmacêuticos vem representando um importante desafio para a pesquisa industrial nos últimos 20 anos, tendo como intuito substituir os antioxidantes sintéticos. Uma vez que os consumidores vêm apresentando rejeição pelo uso destes devido ao seu potencial de toxicidade, há um crescente interesse na obtenção de substâncias antioxidantes provenientes de fontes naturais. Além disso, alguns produtos naturais (ervas aromáticas *in natura* e na forma de extratos) apresentaram, *in vitro*, uma alta atividade antioxidante (MURCIA et al., 2004). Extratos de ervas aromáticas, chá, uva e citros estão entre as principais fontes de antioxidantes naturais estudadas. Deste modo, apesar dos trabalhos já desenvolvidos nesta área, muito do potencial existente permanece inexplorado (SILVA et al., 2010).

Aliado às contribuições à saúde, os compostos naturais também apresentam significativa importância para a aplicação industrial, já que os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria de alimentos são o butil - hidroxitolueno (BHT) e o butil - hidroxianisol (BHA), e estes têm despertado preocupação quanto às doses de segurança e toxicidade, pois podem estar envolvidos em muitos riscos à saúde, incluindo câncer (BARREIROS; DAVID, 2006; BERGAMASCHI, 2010).

A maioria dos compostos antioxidantes possui uma base molecular semelhante, ou seja, pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos e os flavonóides (CAETANO, 2009).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas (OLIVEIRA et al., 2007).

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais tem sido reconhecidas durante séculos, mas foram confirmadas de forma científica apenas recentemente. Por outro lado, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antimicrobianos de ocorrência natural e

eficientes no controle do crescimento de diversos microrganismos incluindo fungos, leveduras e bactérias (DUARTE, 2006).

Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (OLIVEIRA et al., 2007; DUARTE, 2006). O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRASIL, 2006; ARAÚJO, 2010).

Os óleos essenciais são utilizados em diversos setores industriais como, por exemplo, na fabricação de fármacos, perfumes, cosméticos, produtos de higiene e limpeza, alimentos e bebidas. Esses óleos podem ser extraídos de caules, flores, frutos e raízes de diversas espécies de plantas. Na indústria alimentícia, podem atuar como antioxidantes e antibacterianos, além de reproduzir o sabor e odor da planta utilizada no alimento (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; BUSATTA, 2006).

O mercado de óleos essenciais é próspero para países que dispõem de uma grande biodiversidade, como o Brasil, e possuem condições de agregar valor às suas matérias-primas, transformando-as em produtos beneficiados. Por esse motivo é importante pesquisar sobre o óleo essencial de plantas condimentares como o manjeriço e a manjerona. No estado do Paraná, as espécies mais importantes são a camomila e o gengibre, porém outras espécies como o capim limão e eucalipto vêm sendo exploradas. O estado é responsável por 10% das importações de óleos essenciais de diversas plantas. Estes dados revelam a necessidade de expansão desse mercado, tanto no Paraná como no Brasil, nos próximos anos (BARATA et al., 2005; JAKIEMI, 2008).

Devido à tendência atual pela procura de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, torna-se necessário o estudo do uso de condimentos e ervas aromáticas como antioxidantes naturais em substituição aos convencionais BHA e BHT amplamente utilizados. Neste contexto, este estudo tem como objetivo identificar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas presentes em ervas aromáticas comuns na culinária do Sul do Brasil, como a manjerona (*Origanum majorana* L.) e o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do óleo essencial e do extrato hidroalcolico de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriçao (*Ocimum basilicum* L.).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Plantar as mudas de manjerona e manjeriçao nas estufas do horto da UTFPR.
- Preparar os extratos etanolicos das ervas aromaticas;
- Extrair o óleo essencial das plantas, coletadas do horto, por hidrodestilaçao;
- Determinar o teor de compostos fenolicos totais nos extratos hidroalcolicos;
- Determinar o teor de flavonoides totais nos extratos hidroalcolicos;
- Avaliar as propriedades antioxidantes do óleo essencial e do extrato hidroalcolico de cada planta pelo método de sequestro do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picrihidrazil);
- Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos de cada planta contra as bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 (gram-positiva), *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076 (gram-negativa), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 (gram-negativa) e *Bacillus cereus* ATCC 11.778 (gram-positivo) pelo método de difusao em ágar, Concentraçao Inibitória Mínima (CIM) e Concentraçao Bactericida Mínima (CBM);

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são conhecidos desde a antiguidade por possuírem atividades biológicas, como propriedades antibacteriana, antifúngica e antioxidante. As antigas civilizações já tinham por hábito o uso de ervas e aromas como recurso terapêutico, principalmente na medicina chinesa (SIMÕES; SPITZER, 2004). As primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a.C. Atualmente, com a busca cada vez maior por produtos naturais e com a crescente utilização de compostos antioxidantes na medicina, as substâncias naturais, como os compostos fenólicos, tem merecido uma atenção especial (CATÃO et al., 2005).

O consumo de produtos naturais está diretamente relacionado com a diminuição da incidência da taxa de mortalidade provocada por doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares. Acredita-se que os produtos naturais, como frutas e vegetais tem ação antibacteriana e também atividade antioxidante, por possuírem quantidades consideráveis de substâncias fenólicas. Essas substâncias aumentam e potencializam o sistema imunológico do corpo humano induzindo uma resistência sem causar efeitos colaterais ao organismo (HERTOG et al., 1993; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

O uso de antioxidantes naturais é muito importante tendo em vista diversos aspectos tecnológicos e nutricionais, podendo ser destacados: a conservação da qualidade do alimento, podendo substituir os antioxidantes sintéticos (Figura 1), a preservação da saúde humana, por minimizar danos oxidativos e a presença de componentes bioativos, caracterizando os alimentos como funcionais (ARAÚJO, 1995).

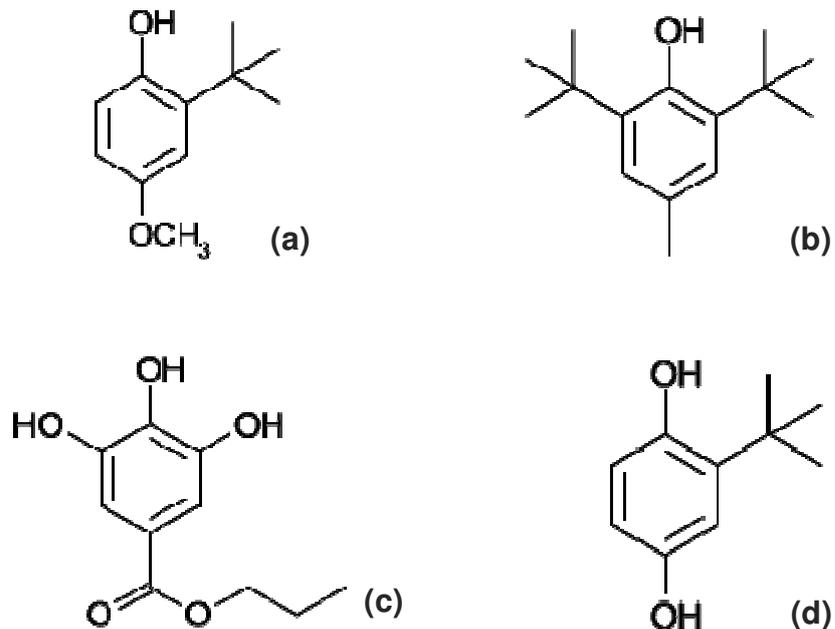


Figura 1 – Estrutura química de alguns antioxidantes sintéticos, (a) BHA, (b) BHT, (c) PG e (d) TBHQ.

O uso de antioxidantes naturais como o α -tocoferol (Figura 2), visando o aumento do prazo de validade de produtos alimentícios é uma constante na área da tecnologia de alimentos. A Resolução n° 04 de 24/11/88 relaciona um total de 13 aditivos permitidos classificados como antioxidantes possíveis de serem adicionados em aproximadamente 40 a 50 alimentos (BRASIL, 1988).

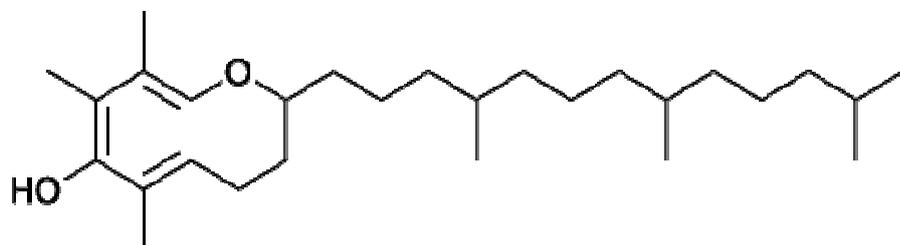


Figura 2 – Estrutura Química do α -Tocoterol.

As especiarias possuem uma posição especial em relação às outras fontes naturais de antioxidantes, pois são usadas tradicionalmente como ingredientes, o

que permite que sejam fácil e diretamente utilizadas, exercendo sua atividade antioxidante nos alimentos e ação conservadora por inibirem ou retardarem a atividade microbiana (JORGE; ANGELO, 2008).

Embora os óleos essenciais sejam bastante estudados, o seu uso em alimentos como substâncias antimicrobianas é bastante limitado devido à avaliação dos sabores, pois doses eficazes contra microrganismos podem mudar a aceitabilidade do produto. Como consequência, há uma demanda crescente para conhecer as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais, para que possa atingir um balanço entre a eficácia como agente antimicrobiano e a aceitabilidade sensorial (BUSATTA, 2006).

Os compostos fenólicos, que agem como antioxidantes, são substâncias amplamente distribuídas na natureza, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas. Esse grande e complexo grupo podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente. Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis (SILVA et al., 2010; BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Estes compostos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas. Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos). Os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila localizados nas várias posições dos anéis benzênicos garantem a esses compostos sua alta atividade antioxidante (SILVA et al., 2010).

Estudos demonstraram que os compostos fenólicos também inibem o crescimento de uma grande variedade de microrganismos. Este mesmo potencial foi detectado de forma natural em algumas plantas medicinais, ervas e temperos da família Lamiaceae, quando avaliados seus óleos essenciais, apresentando entre outras funções biológicas uma atividade antimicrobiana significativa (CANSIAN et al., 2007; BUSATTA, 2006).

Os óleos essenciais extraídos de vegetais têm sido avaliados como inibidores de crescimento de patógenos em alimentos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, dentre outros. A família Lamiaceae consiste em aproximadamente 3500 espécies, sendo exemplos

as espécies de manjeriço (*Ocimum* sp.), manjerona (*Majorana* sp.), alecrim (*Rosmarinus* sp.), sálvia (*Salvia* sp.), orégano (*Origanum* sp.), tomilho (*Thymus* sp.), dentre outras, as quais são estudadas devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas e medicinais (CANSIAN et al., 2007 RADULESCU et al., 2004).

Segundo a Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processos físicos, como destilação por arraste com vapor de água ou outro método adequado (BRASIL, 2007). De acordo com a International Standard Organization (ISO), descrito por Simões e Spitzer (2004), os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis geralmente odoríferas e líquidas.

A designação de “óleo” é devida a características físico-químicas como a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente e sua principal característica é a volatilidade. São normalmente incolores e amarelados quando recém obtidos, e alguns possuem cor naturalmente. Apresentam densidade inferior à da água, possuem odor característico e são diferenciados pelo índice de refração. São solúveis em álcool e em solventes orgânicos e muito pouco solúveis em água (BUSATTA, 2006).

Nos óleos essenciais estão muitos princípios ativos conhecidos, e estes podem estar presentes em certos órgãos das plantas, como nas flores, folhas, cascas, tronco, galhos, raízes, frutos ou sementes. Apesar de todos os órgãos de uma planta poder acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização (SERAFINI et al., 2002).

3.2 MANJERONA (*Origanum majorana* L.)

O *Origanum majorana* L. é uma planta perene, cuja porção subterrânea é formada por um sistema de raízes fibrosas. O caule é muito ramificado, de cor meio avermelhada, que alcança entre 30 e 60 cm. Os ramos são lenhosos, frágeis e quadrangulares, formando uma touceira. A manjerona (*Origanum majorana* L.) é um dos temperos mais utilizados na culinária e que, apesar do seu alto valor medicinal, hoje pouco tem sido empregado na medicina popular. No óleo essencial de manjerona são encontrados isômeros terpênicos, e compostos fenólicos e

flavonóides, além de incluírem carvacrol, timol, triacontano, sitosterol, ácido oleanólico e rosmarínico, hidroquinonas e taninos (FELTROW; ÁVILA, 2000).

Atualmente, seu óleo essencial vem despertando interesse por possuir atividade biológica antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Na indústria de alimentos, o óleo destilado tem larga aplicação, levando em conta sua grande estabilidade de conservação e ausência de contaminação microbiológica. A atividade antioxidante de algumas plantas aromáticas da família das Lamiaceae é muito estudada, especialmente porque os extratos destas plantas exibem atividade em baixas concentrações (BARATTA et al. 1998).

3.3 MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.), especiaria pertencente à família Lamiaceae faz parte de um grupo de plantas medicinais e aromáticas de grande valor econômico, possui dentre seus constituintes químicos, óleos essenciais, flavonóides, taninos, saponinas, ácido caféico e cânfora. Amplamente empregado no preparo de fitoterápicos e pela indústria alimentícia. Desta forma, o uso de antioxidantes naturais, como as especiarias, em destaque o manjericão, pode apresentar estabilidade oxidativa nos produtos alimentícios. Com esta perspectiva, somando-se a restrição do uso em alimentos de antioxidantes sintéticos, tem aumentado o interesse na pesquisa de substâncias naturais com atividades antioxidantes (DUARTE, 2006).

O *Ocimum basilicum* L. é uma planta herbácea, anual ou perene, que ocorre de forma subespontânea no Brasil, atinge até 1 m de altura e possui caule muito ramificado, o seu óleo essencial tem sido extensivamente utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, além de ser utilizado na medicina popular para combater dor-de-cabeça, diarreia, resfriado, etc (LORENZI & MATOS, 2002).

A atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como seqüestrantes de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA, LAJOLO, 2005). Segundo Bonanni (2007), diferentes tipos de condimentos processados como anis, manjericão, hortelã, estragão e manjerona apresentaram elevada capacidade

antioxidante. Em geral são compostos fenólicos que agem como antioxidantes multifuncionais atuando de várias formas: combatendo os radicais livres, quelando metais de transição e interrompendo a reação de propagação dos radicais livres.

3.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os processos de obtenção de óleos essenciais variam conforme a localização do óleo na planta. Os métodos mais comuns são: enfloração; arraste direto por vapor d'água; hidrodestilação; extração com solventes orgânicos; prensagem e extração com fluidos supercríticos (SIMÕES; SPITZER, 2004).

A composição dos óleos essenciais pode sofrer influência de acordo com o método de extração utilizado, pois suas propriedades bioativas podem ser comprometidas. As características físico-químicas podem ser alteradas pelas condições operacionais empregadas na extração, bem como seus efeitos terapêuticos. Graças ao avanço da tecnologia, hoje se dispõe de métodos que permitem extrair óleos essenciais com um maior grau de pureza e concentração, como é o caso da extração com fluidos supercríticos, que na indústria alimentícia utiliza gás carbônico na extração, fazendo com que não haja resíduos tóxicos (JAKIEMI, 2008).

O método de enfloração é utilizado para extração de óleos essenciais de matérias-primas delicadas como pétalas de flores. As pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um determinado tempo. Em seguida as pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. O álcool então é destilado a baixa temperatura, obtendo-se assim o óleo essencial (JAKIEMI, 2008).

A prensagem é utilizada para extração de óleo essencial de frutas cítricas, que é encontrado nos tecidos periféricos, no caso nas cascas. Estas são prensadas e a camada que contém o óleo essencial separada por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (SIMÕES; SPITZER, 2004).

A extração com solventes orgânicos é usada no mundo todo para obter maior rendimento ou produtos que não podem ser obtidos por nenhum outro

processo. Geralmente são utilizados solventes apolares como o diclorometano e o éter (SIMÕES; SPITZER, 2004).

A extração por fluidos supercríticos é uma técnica que utiliza o poder do solvente em temperatura e pressão vizinhas ao ponto crítico. O solvente mais utilizado nesta técnica é o dióxido de carbono (CO_2), devido ao seu baixo custo, à temperatura crítica considerada baixa ($31,1^\circ\text{C}$) e a pressão crítica facilmente alcançável (72,85 atm), além de ser um solvente inodoro, quimicamente inerte e sem risco ambiental. Esta técnica vem sendo considerada uma das mais promissoras para a área da alimentação. A única desvantagem é que o processo demanda custos altos, dificultando a implantação da técnica (JAKIEMIU, 2008).

Na extração por arraste de vapor o material vegetal a ser extraído, geralmente moído ou triturado, é colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, assim os óleos essenciais são arrastados pelo vapor de água e a mistura de vapores é conduzida a um condensador, onde os vapores voltam ao estado líquido, sendo separados pela diferença de densidade (RODRIGUES, 2002).

A hidrodestilação é um método antigo e versátil, sendo o mais usado comercialmente no Brasil. O material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, o vapor faz com que as paredes celulares se abram e o óleo que está entre as células evapore junto com a água que vai para o condensador, onde é resfriado e separado por diferença de densidade. No caso das produções em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger (SIMÕES; SPITZER, 2004).

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS

Nos últimos anos, as pesquisas com antioxidantes naturais tiveram grande destaque junto à comunidade científica. As suspeitas de que os antioxidantes sintéticos sejam carcinogênicos tem direcionado os estudos para os compostos naturais que apresentam esta capacidade. É crescente o interesse para que os antioxidantes naturais substituam os artificiais ou atuem em conjunto com os mesmos, reduzindo a sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002; ALEZANDRO, 2009).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de diminuir ou prevenir significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração quando comparado a substância oxidável de interesse. Outra definição é a de antioxidantes em alimentos, como uma substância que em pequena quantidade é capaz de prevenir ou retardar a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, como as gorduras (SHIRAHIGUE, 2008).

Antioxidantes naturais extraídos de plantas podem ser usados como alternativas aos antioxidantes sintéticos, devido a seu efeito equivalente ou maior na inibição da oxidação. Assim, antioxidantes naturais presentes em alimentos e outros materiais biológicos tem atraído considerável interesse nas últimas duas décadas devido à sua presumida segurança, potencial nutricional e efeitos terapêuticos. Alimentos ricos em antioxidantes tem sido apresentados como tendo papel essencial na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas, onde as mais conhecidas são as doenças de Parkinson e Alzheimer e problemas causados pelo envelhecimento das células (GÓMEZ, 2003; GENENA, 2005).

Ervas e especiarias são importantes antioxidantes naturais, e isso tem sido atribuído à presença de compostos fenólicos nos óleos essenciais. Sendo assim, dentre os vários estudos sobre compostos naturais com ação antioxidante, muitos deles estão centralizados nos compostos fenólicos que podem atuar como doadores de hidrogênio ao radical livre, dando origem a um radical estável (Figura 3), que por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas, ou como agentes quelantes complexando íons metálicos (Figura 4), principalmente cobre e ferro, que atuam como catalisadores nos processos oxidativos (RAMALHO; JORGE, 2006; CAETANO, 2009).

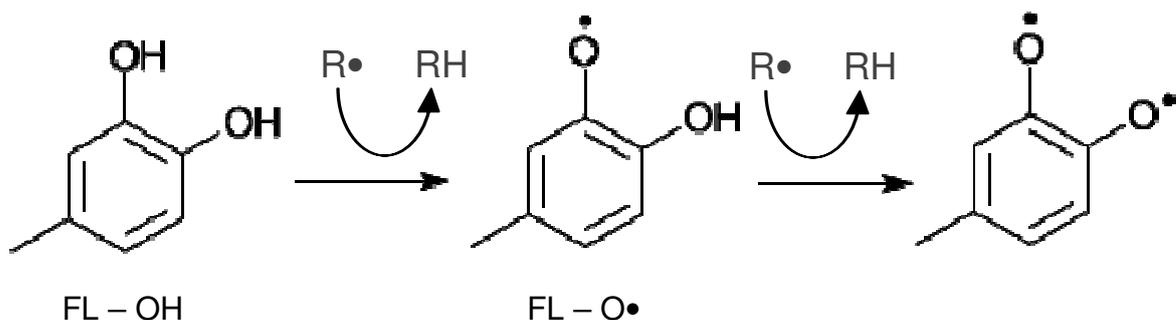


Figura 3 – Esquema de sequestro de radicais livres (R•) por flavonóides (FL).

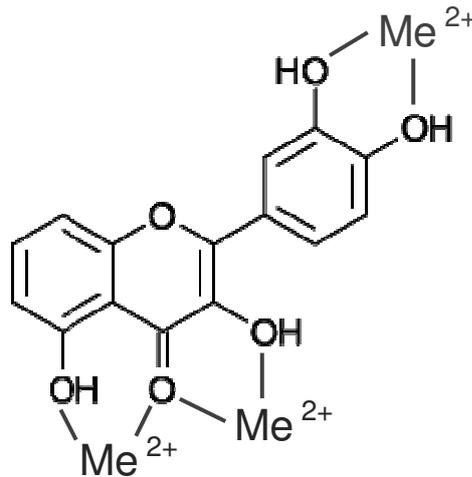


Figura 4 – Sítios de ligações de metais em flavonóides.

Esses compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um agrupamento hidroxila, sendo assim o composto mais simples é o fenol (Figura 5).

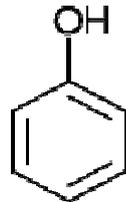


Figura 5 – Estrutura química do fenol.

Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos) (SILVA et al., 2010).

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C_{15}) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos C6-C3-C6, em que os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B) sendo conectados por uma ponte de três carbono que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (com exceção das chalconas) e uma carbonila (LOPES et al.,

2003) (Figura 6). De acordo com as características químicas e as respectivas substituições dos R_n por hidroxilas os flavonóides são divididos em diversas classes, como por exemplo, os flavanóis, flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas entre outros (OLDONI, 2007).

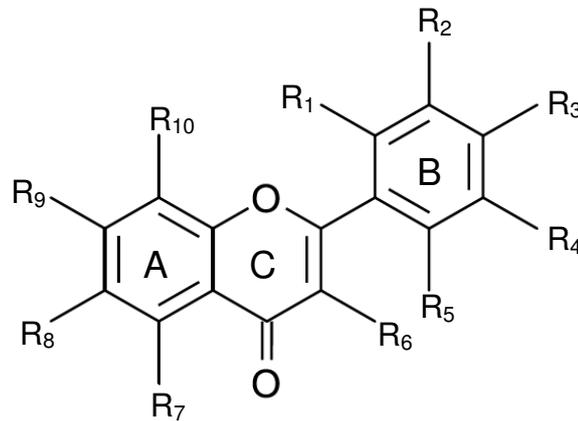


Figura 6 – Estrutura básica dos flavonóides onde as diferentes classes ocorrem de acordo com as substituições de R_n .

Na classe dos não-flavonóides ou ácidos fenólicos estão os derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos, os diferentes compostos são gerados de acordo com as substituições de R_n (Figura 7). Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo $-CO_2H$ em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila (SILVA et al., 2010).

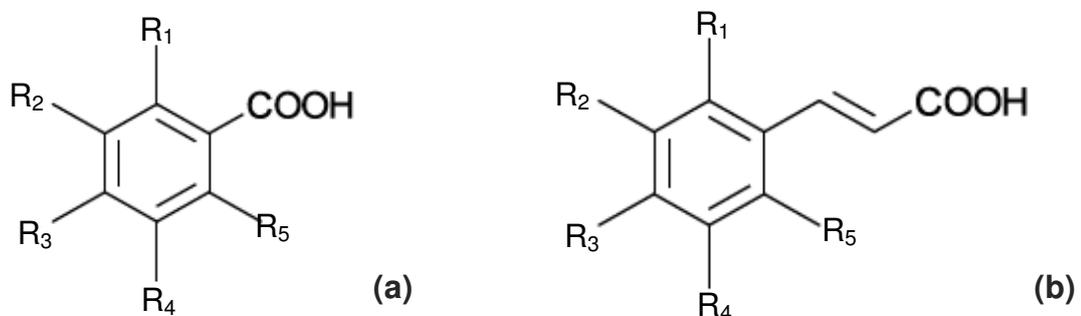


Figura 7 – Estrutura básica dos ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico (a) e cinâmico (b) onde os diferentes compostos ocorrem de acordo com as substituições de R_n .

3.5.1 Métodos de Análise de Atividade Antioxidante *in vitro*

Diversos métodos têm sido utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* e podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados em estudos de cinética química, denominados de métodos diretos e ensaios mediados pela transferência de elétrons, métodos indiretos. O primeiro método é caracterizado pela presença de uma competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres, já o segundo caracteriza-se pela habilidade do antioxidante em sequestrar radicais livres (COSTA et al., 2009).

Os métodos *in vitro* são avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato. Dentre os métodos espectrofotométricos de atividade antioxidante *in vitro* os mais utilizados são: o método do DPPH• radical (2,2-difenil-1-picrihidrazil), o sistema β -caroteno/ácido linoléico (BCAL), o método ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e o FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (BERGAMASCHI, 2010).

O método do descoloramento do β -caroteno é amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de vários tipos de amostras, tais como, compostos puros, extratos de plantas, grãos, frutas, vegetais entre outros, principalmente por não recorrer a altas temperaturas, permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis (ABDALLA et al., 1999). Neste método o ácido linoléico em presença de oxigênio forma o radical peroxil, que reage com o β -caroteno resultando na perda da coloração da solução. A adição de uma amostra que contenha antioxidantes pode reagir com o radical peroxil, contribuindo para retardar a queda de coloração do β -caroteno. Portanto os antioxidantes presentes nas amostras podem ser facilmente monitorados pelo branqueamento da cor da solução (MEDINA, 2009).

O ensaio do DPPH• tornou-se bastante popular no estudo dos antioxidantes naturais por ser um método simples e altamente sensível. O método opera pela medida direta da doação do átomo de hidrogênio ou transferência de elétron de um antioxidante em potencial a moléculas do radical livre (DPPH•) (SHIRAHIGUE, 2008). Esse método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH•, a qual

apresenta um máximo de absorção em 517nm com coloração violeta, na presença de um antioxidante doador de hidrogênio o DPPH• pode abstrair um elétron ou radical hidrogênio do antioxidante para se tornar uma molécula estável (Figura 8), que raramente pode ser oxidada irreversivelmente, diminuindo assim a absorbância e passando da coloração violeta para o amarelo (BERGAMASCHI, 2010).

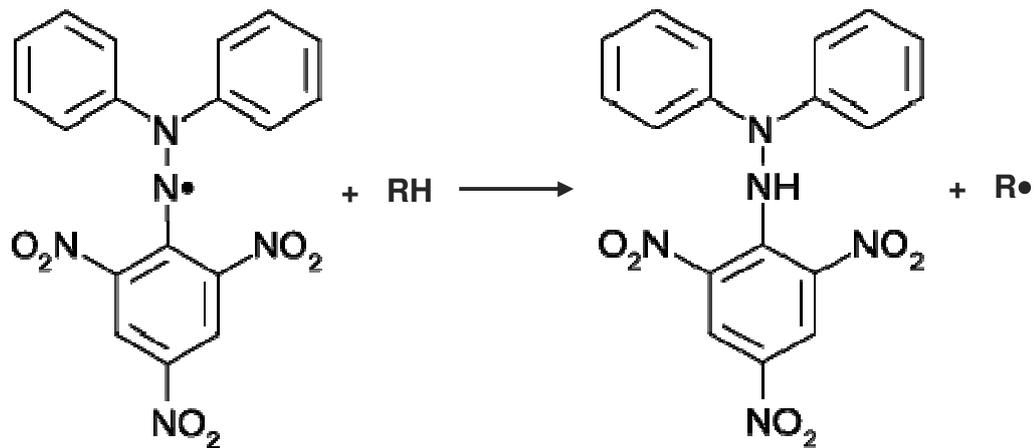


Figura 8 – Reação do radical livre DPPH• com uma molécula antioxidante.

Os resultados do DPPH• são expressos de diversas maneiras, dentre eles o EC_{50} o qual tem sido muito utilizado, representando a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Esse método foi introduzido como sendo um método fácil e preciso para uso em frutas e extratos de plantas (ATMANI et al., 2009).

O método ABTS determina a atividade antioxidante total pela captura do radical livre ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)), e tem sido amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante em alimentos e bebidas, devido à sua aplicabilidade na fase aquosa. A atividade antioxidante de produtos de produtos naturais é determinada pela descoloração do ABTS, medindo-se a redução do radical a uma absorbância de 734nm. A absorbância da reação da mistura de ABTS e um antioxidante é comparada com atividade do antioxidante sintético Trolox (padrão), e os resultados são expressos em μMol de Trolox TEAC.g^{-1} (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (BIGLARI et al., 2008; BERGAMASCHI, 2010).

O ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro), está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , quando isso ocorre na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com uma absorção máxima a 593nm. Este ensaio oferece resultados rápidos, porém apresenta como desvantagens o fato de que a curva padrão deve ser realizada com um antioxidante que seja solúvel em água e que geralmente não consegue medir todos os antioxidantes presentes em uma matriz complexa (APAK et al., 2004).

3.6 ATIVIDADE ANTINICROBIANA DE PLANTAS

Muitos compostos fenólicos são adicionados aos alimentos como agentes antioxidantes e/ou antimicrobianos, sendo que a mistura de dois ou mais compostos em quantidades adequadas, podem apresentar atividade antimicrobiana sobre as bactérias mais resistentes. A ação antimicrobiana dos compostos fenólicos está relacionada com a inativação das enzimas celulares, além de mudanças na permeabilidade das membranas celulares (CARPES, 2008).

Os óleos essenciais extraídos de plantas tem sido avaliados como inibidores de crescimento de patógenos em alimentos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella choleraesius* dentre outros (CANSIAN et al., 2007). Embora haja exceções, na literatura, em geral as bactérias gram-positivas são mais susceptíveis do que as bactérias gram-negativas aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais. Uma possível explicação para esta atividade pode estar relacionada à dificuldade dos óleos essenciais em difundir a membrana externa, pois existe uma barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas, embora esta não seja totalmente impermeável, devido a isso, as bactérias gram-negativas são relativamente resistentes (Figura 9) (BUSATTA, 2006).

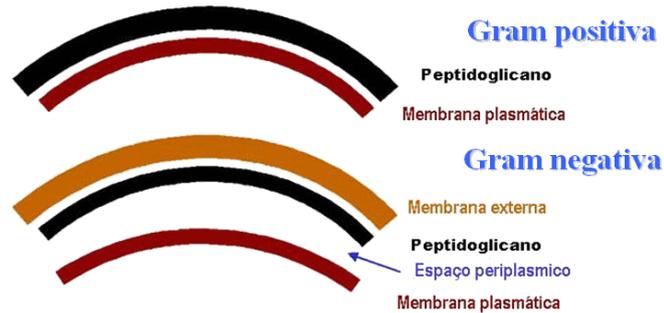


Figura 9 – Diagrama simplificado da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Fonte: The Board of Trustees of the University of South Carolina (2010).

Dentre as plantas aromáticas com atividade antimicrobiana destacam-se as da família Lamiaceae, como o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e a manjerona (*Origanum majorana* L.). Embora o mecanismo de ação dos óleos essenciais não seja totalmente conhecido, sua atividade biológica é avaliada de diferentes formas, como na ativação e/ou inativação de compostos, que ao romper ou desestruturar as membranas celulares, causam perdas de várias enzimas e nutrientes. Em alimentos, alguns componentes do óleo essencial também podem interferir no sistema respiratório bacteriano (BARATTA et al., 1998; CANSIAN et al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras das plantas foram coletadas na estufa da UTFPR – *campus* Pato Branco - PR. Imediatamente após a colheita as plantas foram secas em estufa a 40°C, moídas em moinho de facas Marconi modelo MA – 630 e guardadas em geladeira a 7°C, até o momento das análises.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS ERVAS AROMÁTICAS (EEEE)

Para o preparo dos extratos etanólicos das ervas aromáticas foram pesados 2 gramas de cada erva desidratados e moídos, obtidos conforme o item 4.1. A extração foi feita com 15 mL de etanol a 70% (v/v), em banho de água a 70°C, por 30 minutos (CARPES, 2008). Em seguida, foi realizada uma filtração em papel de filtro Whatman nº 5, e os sobrenadantes (EEEE) foram transferidos para tubos de ensaio com tampas de rosca. Os EEEA foram utilizados para as análises de atividade antioxidante, antimicrobiana, compostos fenólicos totais e flavonóides totais.

4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ERVAS AROMÁTICAS POR HIDRODESTILAÇÃO

A hidrodestilação foi feita utilizando-se aparelho de Clevenger a partir de 50 g de cada erva secas e moídas, obtidas conforme o item 4.1, e 800 mL de água destilada. A extração foi efetuada por três horas, e as amostras de óleo essencial das ervas aromáticas (OEEA) obtidas foram transferidas para tubos de ensaio e

levadas ao freezer para posterior análise de atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

4.4 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Este método envolve a oxidação de fenóis por um reagente amarelo de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteu), e a medida colorimétrica de um complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino. Os EEEA foram diluídos em etanol a 70% (v/v) 1:240 (v/v). Uma alíquota de 0,5 mL dos respectivos extratos diluídos foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10 (v/v). Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 a 4% (m/v). As soluções foram incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e após 2 horas, foram realizadas as leituras da absorbância a 740 nm em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1800. O branco foi conduzido nas mesmas condições. A curva analítica foi construída contendo 2,5, 5, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico e os resultados expressos em mg EAG/g de manjeriço/manjerona. (EAG: equivalente em ácido gálico) (SINGLETON et al., 1999). Essas análises foram realizadas em triplicata.

4.5 TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A concentração de flavonóides totais foi determinada conforme método descrito por Park et al. (1995), com algumas modificações. Uma alíquota de 0,5 mL dos extratos de manjeriço e manjerona diluídos 1:20 e 1:10 (v/v) respectivamente foi transferida para tubos de ensaio e adicionado 4,3 mL de etanol a 70% (v/v), 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10% (m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio a 10% (m/v). Uma série controle foi realizada paralelamente, nesta foi adicionado etanol a 70%

(v/v) em substituição ao nitrato de alumínio. Após 40 minutos de repouso no escuro a temperatura ambiente, as leituras da absorbância foram feitas em espectrofotômetro SHIMADZU Modelo UV 1800, a 415 nm. Os tubos em branco foram conduzidos nas mesmas condições, sem a adição de nitrato de alumínio. A curva analítica foi construída contendo 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL de quercetina e os resultados expressos em mg EQ/g de manjeriço/manjerona. EQ: equivalente em quercetina. Essas análises foram realizadas em triplicata.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH•

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH• foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995). O radical DPPH• (1,1-difenil-2-picrihidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante os óleos essenciais e os extratos hidroalcoólicos foram reagidos com o radical estável DPPH• em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH• possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. Os EEEA foram diluídos a concentrações finais de 0,32 mg/mL até 0,89 mg/mL, e os OEEA de 0,1 µL/mL até 4 µL/mL.

A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH• 0,5 mM em etanol. Para cada amostra e substância de referência foi realizado em paralelo, um teste branco com adição de etanol em substituição a solução de DPPH• 0,5 mM, para descontar uma possível coloração que pudesse influenciar na interpretação dos resultados. Também foi feito um controle contendo 3,5 mL de etanol e 0,3 mL de DPPH• 0,5 mM. As substâncias de referência – os antioxidantes sintéticos comerciais BHT, BHA e α -tocoferol – foram avaliados nas concentrações finais de 10 µg/mL até 125 µg/mL.

Fez-se uma curva cinética da atividade antioxidante de cada amostra e das substâncias de referência, para determinar o tempo necessário para chegar à estabilização das absorvâncias. A redução do radical DPPH• foi medida por meio de um monitoramento contínuo do declínio da absorvância a 517 nm, a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada após 80 minutos de reação (fase estável) em relação ao controle conforme, através do EC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH• inicial da reação.

Os valores de EC₅₀ foram calculados por regressão linear de gráficos onde o eixo das abscissas (X) representa as concentrações em mg/mL, µL/mL e µg/mL no caso dos EEEA, OEEA e substâncias de referência, respectivamente e o eixo das ordenadas (Y) a %AA conforme a Equação 1. Essas análises foram realizadas em triplicata.

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right\} \text{ (Eq.1)}$$

4.8 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EEEA E OEEA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

O método de difusão em ágar foi aplicado nos EEEA e OEEA, segundo Rabanal et al. (2002). Neste estudo, utilizaram-se quatro bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 e *Bacillus cereus* ATCC 11.778). Foram aplicados 10 µL dos EEEA puros, e em concentrações de 2.133,33 µg/mL a 66,67 µg/mL (diluição seriada de razão 2), em discos de papel de filtro Whatman nº 5 estéreis, dispostos nas placas de petri previamente inoculadas. Para os OEEA foram aplicados 10 µL destes puros. Após a incubação em estufa a 37°C por 24 horas, a atividade antibacteriana foi determinada através da medida do diâmetro da zona de inibição (mm) ao redor de cada disco. O solvente utilizado na extração, etanol 70% (v/v), foi usado como

controle negativo e a ampicilina 10µg foi usada como controle positivo. Os testes foram realizados em duplicata.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM MEIO LÍQUIDO

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita por Duarte (2006), e os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 e *Bacillus cereus* ATCC 11.778. Os inóculos foram preparados a partir de colônias com 24 horas de incubação em meio BHI (Brain heart infusion) sendo ressuspensos em tubos contendo soro fisiológico estéril e ajustados para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL na escala de Mc Farland.

Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas foi inoculado em 100 mL do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Após a homogeneização, tubos contendo 4960 µL de caldo BHI, previamente inoculados foram adicionados de 40 µL dos extratos e óleos essenciais, com concentrações de 2.133,33 µg/mL a 66,67 µg/mL e 40 µL/mL a 1,25 µL/mL (diluição seriada de razão 2), respectivamente, e incubados em estufa a 37°C por 24h. O branco foi feito com caldo BHI antes de ser inoculado. Foi considerada CIM a menor concentração do extrato e óleo essencial em que não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura de absorbância menor que 0,05 a 660 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A determinação da CBM foi realizada de acordo com a técnica descrita por Duarte et al. (2006), onde foram utilizados placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI (Brain heart infusion).

Baseados nos resultados positivos obtidos no teste da CIM foram utilizados como inóculo as suspensões provenientes dos tubos que apresentaram resultado de leitura de absorbância, a 660 nm, inferior a 0,05. Uma alíquota de 50 µL das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas de ágar BHI esterilizado a 37°C por 24 horas. A CBM foi considerada a menor concentração que causou 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMOSTRAS DE MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.) E MANJERONA (*Origanum majorana* L.)

A Figura 10 ilustra as ervas que foram coletadas na estufa da UTFPR – campus Pato Branco – PR, para as análises. Após a colheita, as plantas foram secas em estufa a 40°C (Figura 11) e moídas em moinho de facas Marconi modelo MA – 630 (Figura 12). A Figura 13 mostra o aspecto das ervas trituradas, utilizadas no preparo dos extratos e do óleo essencial utilizados nos ensaios.



Figura 10 – Ervas aromáticas coletadas para as análises, (a) manjerona (*Origanum majorana* L.) e (b) manjericão (*Ocimum basilicum* L.).



Figura 11 – Ervas aromáticas sendo secas em estufa, (a) manjerona (*Origanum majorana* L.) e (b) manjericão (*Ocimum basilicum* L.).



Figura 12 – Moinho de facas utilizado para moer as ervas aromáticas.



Figura 13 – Aspecto das ervas trituradas utilizadas nos ensaios, (a) manjerona e (b) manjeriço.

5.2 EXTRATOS ETANÓLICOS DAS ERVAS AROMÁTICAS (EEEA)

As ervas desidratadas e moídas foram extraídas com etanol a 70% (v/v) em banho-maria a 70°C, por 30 minutos (Figura 14) (CARPES, 2008). Os EEEA apresentaram uma coloração verde escuro bastante homogêneo (Figura 15).

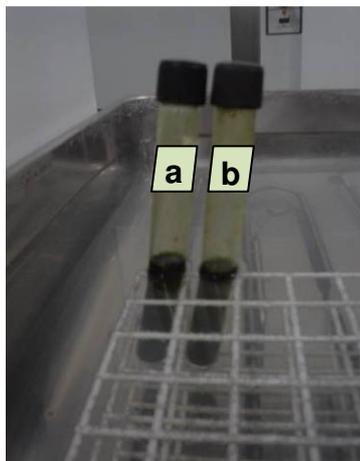


Figura 14 – Extração das ervas aromáticas em banho-maria, (a) manjeriço e (b) manjerona.

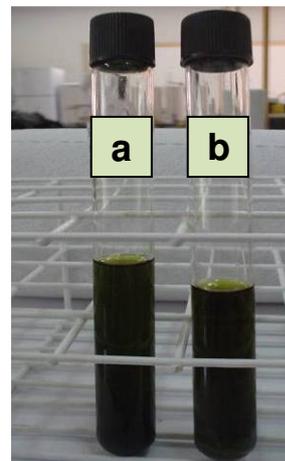


Figura 15 – EEEA utilizados para as análises, (a) manjeriço e (b) manjerona.

5.3 ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ERVAS AROMÁTICAS (OEEA)

A hidrodestilação foi feita utilizando-se aparelho de Clevenger por três horas (Figura 16). A Figura 17 mostra o OEEA obtido, e que foi utilizado na realização das análises.

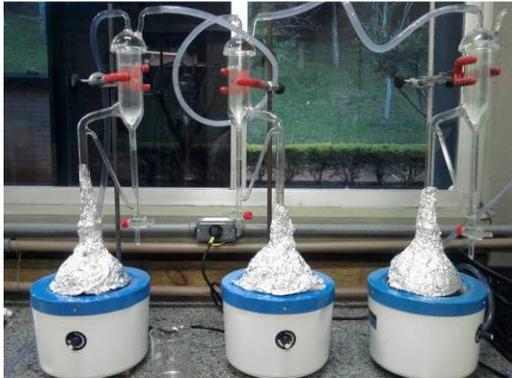


Figura 16 – Hidrodestilação das ervas aromáticas.

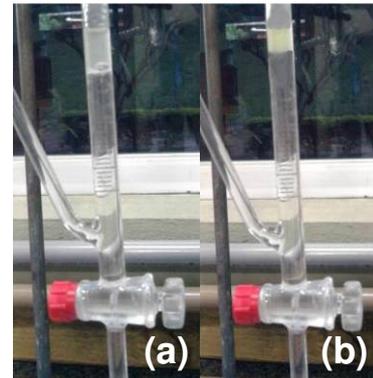


Figura 17 – OEEA utilizados nas análises, (a) manjeriçã e (b) manjerona.

5.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EEEA

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais a saúde humana (DORMAN et al., 2003).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. Para se medir a capacidade antioxidante é necessária a extração de compostos fenólicos de efetiva atividade. Em geral, soluções de etanol ou metanol contendo um pouco de água são mais eficientes na extração de compostos fenólicos do que água, etanol ou metanol puros (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

A Tabela 1 apresenta os resultados dos teores de compostos fenólicos e flavonóides totais do manjeriçã (*Ocimum basilicum* L.) e manjerona (*Origanum*

majorana L.). O extrato de manjeriço apresentou teores de compostos fenólicos e de flavonóides superiores aos valores apresentados pelo extrato de manjerona (Figura 18).

Tabela 1 – Teor dos compostos fenólicos e flavonóides totais dos EEEA.

Amostras	Fenólicos Totais (mg EAG/g)	Flavonóides Totais (mg EQ/g)
Manjeriço (<i>Ocimum basilicum</i> L.)	63,499 ± 0,021	14,879 ± 0,029
Manjerona (<i>Origanum majorana</i> L.)	41,244 ± 0,027	7,363 ± 0,024

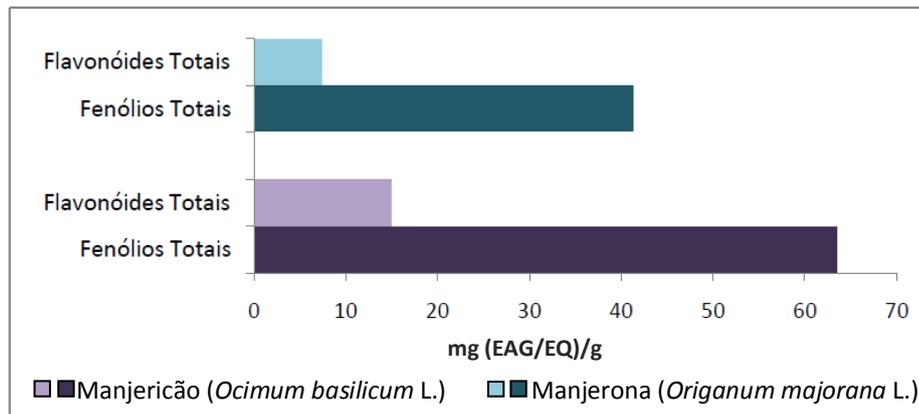


Figura 18 – Compostos fenólicos e flavonóides totais dos EEEA.

O teor de compostos fenólicos totais foi calculado através da equação da reta de uma curva padrão de ácido gálico ($R^2 = 0,9985$) (Figura 19). O gradiente de coloração da curva padrão pode ser observado na Figura 20, que variou de azul intenso até um azul claro.

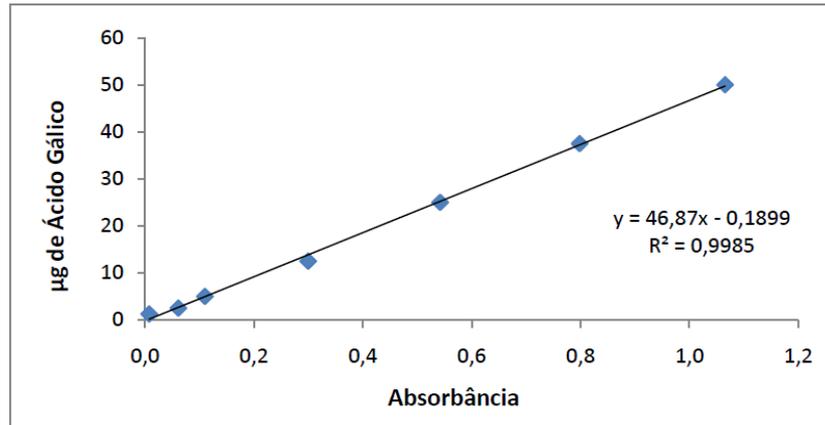


Figura 19 – Curva padrão de ácido gálico.

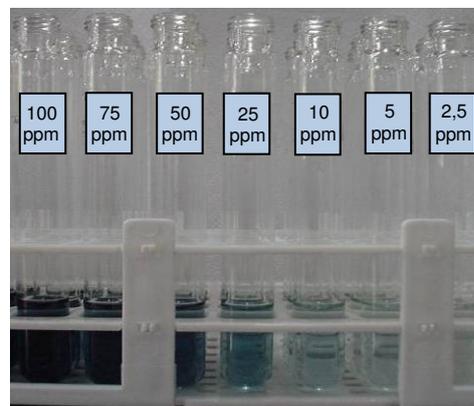


Figura 20 – Gradiente de coloração da curva padrão de ácido gálico.

Ravelli (2011) encontrou 45,90 mg EAG/g na manjerona (*Origanum majorana* L.), os quais foram extraídos dos extratos utilizando uma mistura etanol:água (80:20 v/v). Para a mesma esta mesma erva e com extratos preparados a partir de uma mistura metanol:água (62,5:37,5 v/v) Proestos et al. (2005) encontrou uma concentração de compostos fenólicos totais igual a 16,9 mg EAG/g. Shan et al. (2005) encontrou 36,4 mg EAG/g no manjericão (*Ocimum basilicum* L.) por meio de extratos preparados com uma mistura metanol:água (80:20 v/v), Genovese et al. (2011) por meio de extratos preparados a partir de uma mistura metanol:água (70:30 v/v) encontrou 52,5 mg EAG/g e Wongsu et AL. (2011) encontrou 38,48 mg EAG/g a partir de extratos aquosos.

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto,

é conveniente a introdução de alternativas mais simples, baratas e procedimentos que permitem uma análise rápida. Uma das técnicas que se enquadram bem nesse contexto é a determinação de flavonóides totais por espectrometria na região do UV, usando nitrato de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em etanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. Na análise a leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se nitrato de alumínio em etanol. Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (MARCUCCI et al.,1998). A figura 21 representa a análise realizada por Marcucci et al. (2008) com cloreto de alumínio.

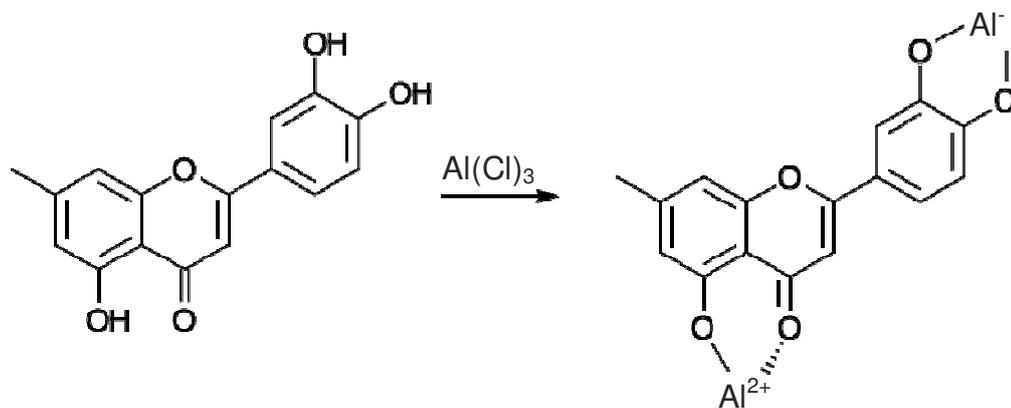


Figura 21 – Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução de cloreto de alumínio.

O teor de flavonóides totais foi calculado através da equação da reta de uma curva padrão de quercetina ($R^2 = 0,9932$) (Figura 22). O gradiente de coloração da curva padrão pode ser observado na Figura 23, o qual variou de verde intenso a amarelo claro.

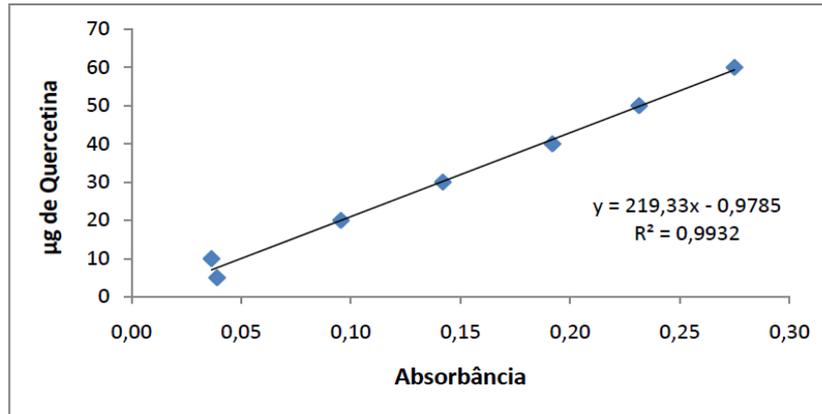


Figura 22 – Curva padrão de quercetina.

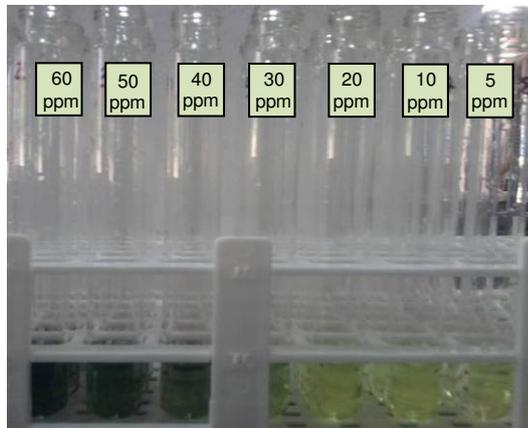


Figura 23 – Gradiente de coloração da curva padrão de quercetina.

Genovese et al., (2011) em seu estudo sobre a avaliação da capacidade antioxidante e do conteúdo de flavonóides para o desenvolvimento de alimentos funcionais encontrou 8,65 mg EQ/g no manjericão (*Ocimum basilicum* L.) por meio de extratos preparados com uma mistura metanol:água (70:30 v/v).

O uso do nitrato de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóides na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a

proporção de flavonas. Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (415 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 415 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (MARCUCCI et al., 1998).

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método, pois normalmente o que se faz é estabelecer limites inferiores e superiores, dentro dos quais os valores encontrados devem se situar nas condições prescritas pelo método.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EEEA E OEEA

5.5.1 Cinética de reação do DPPH•: determinação do tempo de estabilização de reação

O radical DPPH• tem sido muito usado para se avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres em produtos naturais. A atividade antioxidante do radical livre estável DPPH• se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para essa espécie radicalar, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura (LEJA et al., 2007).

A evolução da reação cinética depende da natureza do antioxidante a ser testado. Podem ocorrer três tipos de comportamentos cinéticos entre as amostras: cinética rápida, quando reagem rapidamente com o DPPH•, atingindo o final da reação em menos de um minuto; cinética intermediária, quando o final da reação é atingido em até trinta minutos, e cinética lenta quando a reação demora mais de uma hora para terminar (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Desta forma, fez-se necessária a determinação da cinética dos EEEA e OEEA, pois há substâncias antioxidantes que reagem de forma diferenciada. Além disso, os EEEA e os OEEA possuem uma grande variedade de compostos com

potencial antioxidante e, desta forma, é imprescindível se avaliar o comportamento de cada amostra, frente ao radical DPPH•.

A redução do radical do DPPH• foi medida por meio do monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm, com simultânea mudança de coloração, de violeta para amarela, característico do radical reduzido (Figura 24). Concentrações crescentes dos EEEA, OEEA e substâncias padrões (BHT, BHA e α -tocoferol) foram submetidas à reação e as absorbâncias lidas a cada 20 minutos até valores estáveis de absorção.

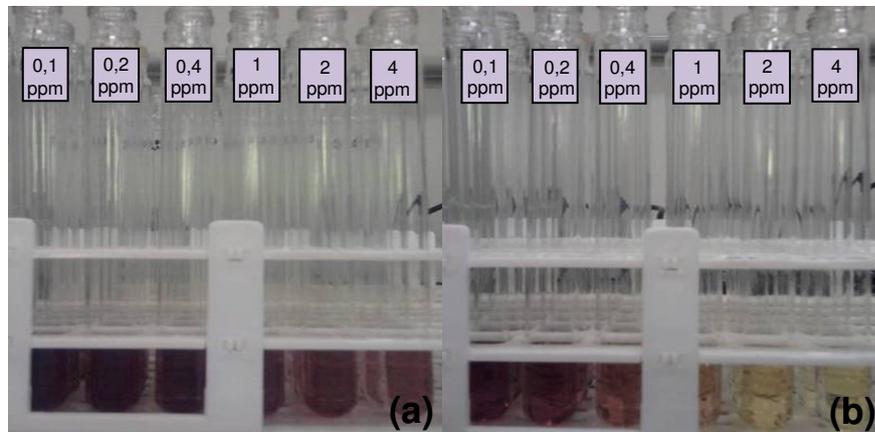


Figura 24 – Mudança de coloração da reação do radical DPPH com os compostos bioativos presente no óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), (a) no tempo de 20 minutos e (b) após 80 minutos.

As Figuras 25 e 26 ilustram a cinética dos EEEA, OEEA respectivamente, para determinação do tempo necessário de estabilização da reação com o DPPH•, sendo que este foi de 80 minutos para os óleos essenciais e extratos das ervas. Desta forma, as análises de atividade antioxidante de sequestro de radical livre DPPH• foram determinadas com 80 minutos de reação.

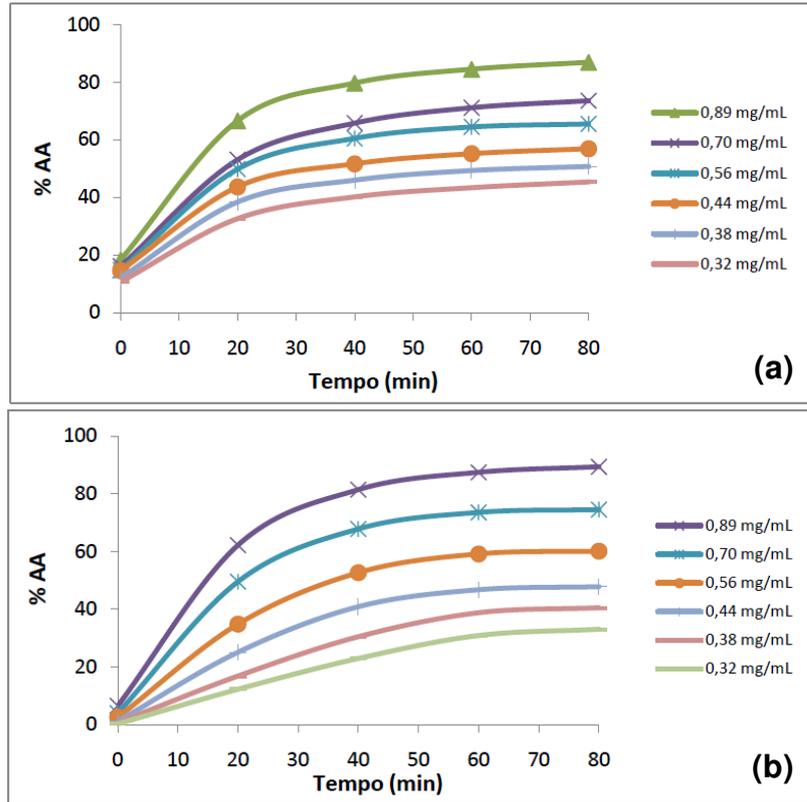


Figura 25 – Cinética de redução do DPPH (porcentagem de atividade antioxidante) dos EEEA, (a) manjericão (*Ocimum basilicum L.*) e (b) manjerona (*Origanum majorana L.*).

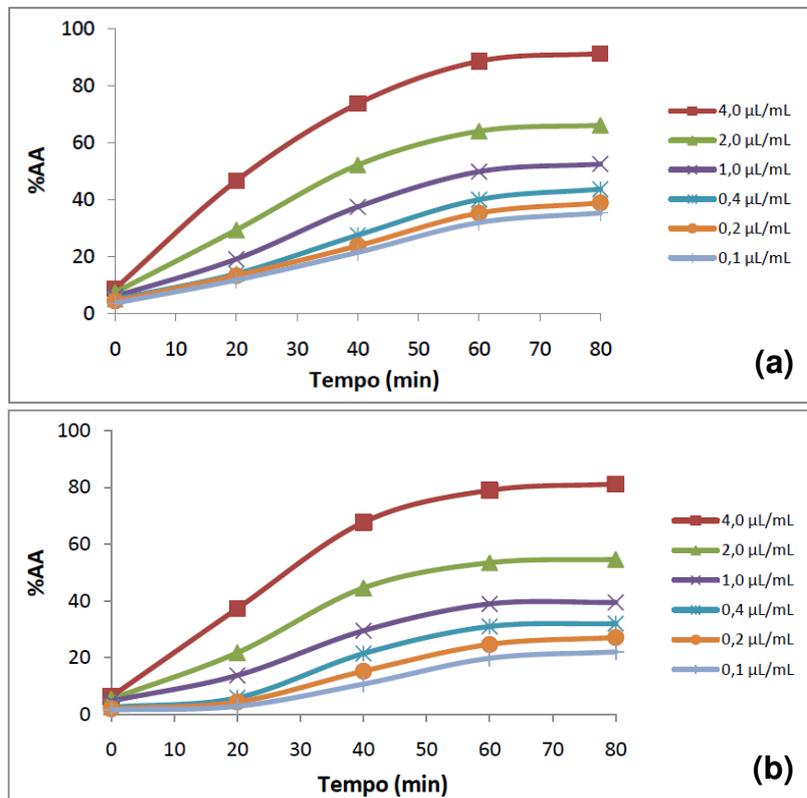


Figura 26 – Cinética de redução do DPPH (porcentagem de atividade antioxidante) dos OEEA, (a) manjericão (*Ocimum basilicum L.*) e (b) manjerona (*Origanum majorana L.*).

A Figura 27 mostra a cinética de reação do DPPH com os antioxidantes sintéticos (BHA e BHT) e o antioxidante natural α -tocoferol, usados como padrão. Na figura 27(a) é possível verificar que o tempo de estabilização da reação com o α -tocoferol foi de 40 min enquanto que os antioxidantes sintéticos BHT e BHA precisaram de 80 min para estabilizar a reação de sequestro do radical livre. Estes resultados vêm de encontro com os estudos feitos por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) os quais, constataram que o BHT e BHA apresentam uma cinética lenta de reação com o DPPH, enquanto que a cinética de reação do α -tocoferol com o DPPH apresentam uma cinética intermediária.

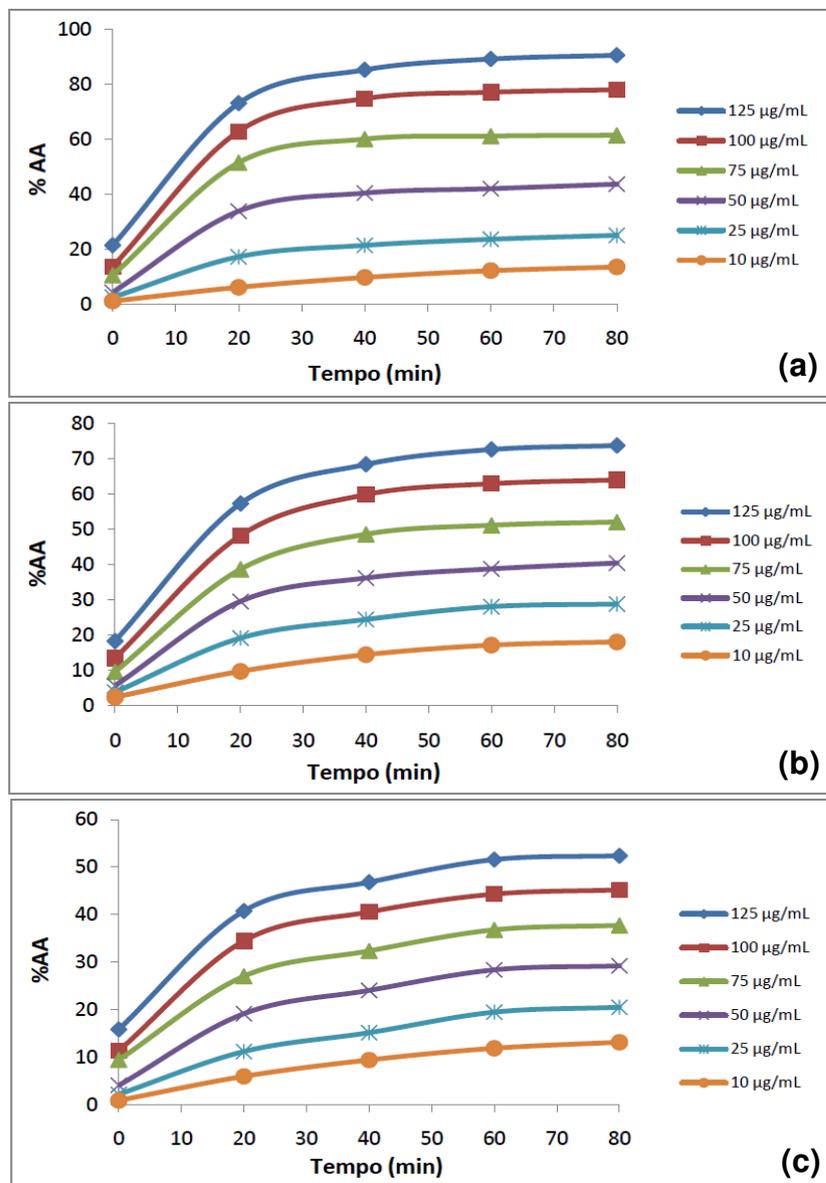


Figura 27 – Cinética de redução do DPPH (porcentagem de atividade antioxidante) das substâncias de referência, (a) α -tocoferol, (b) BHA e (c) BHT.

5.5.2 Atividade de seqüestro do radical livre DPPH•

Após a avaliação da cinética da reação, a atividade antioxidante foi expressa em termos de EC₅₀, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH• inicial da reação no tempo em que o extrato atingiu a estabilidade, no caso 80 minutos para os extratos etanólicos (EEEE) e óleos essenciais (OEEA). Desta forma, quanto menor o valor do EC₅₀, maior é a capacidade antioxidante das amostras analisadas.

As Figuras 28, 29 e 30 apresentam o cálculo da meia vida (EC₅₀), dos EEEA, OEEA e substâncias de referência (BHA, BHT e α-tocoferol) respectivamente. Os valores do EC₅₀ foram determinados por meio da equação da reta de suas respectivas curvas que expressam a atividade antioxidante pela concentração, utilizando a fórmula de Mensor et al. (2001) (Eq.1).

$$\%AA = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\} \text{ (Eq.1)}$$

Os valores do EC₅₀ dos EEEA, OEEA e substâncias de referência podem ser conferidos na Tabela 2 e Figura 31. Tanto nos EEEA, quanto nos OEEA, o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) apresentaram os menores valores de EC₅₀ e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante em termos de seqüestro do radical livre DPPH•, corroborando com os resultados de compostos fenólicos e flavonóides totais, sendo que o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) apresentou uma maior quantidade destes, que são responsáveis pela capacidade antioxidante.

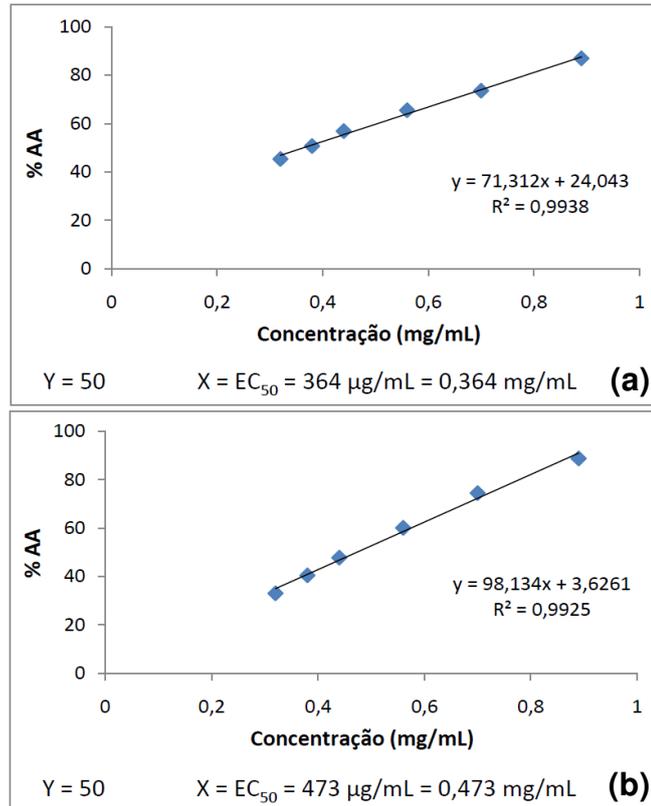


Figura 28 – Cálculo do EC_{50} para os EEEA, (a) manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e (b) manjerona (*Origanum majorana* L.).

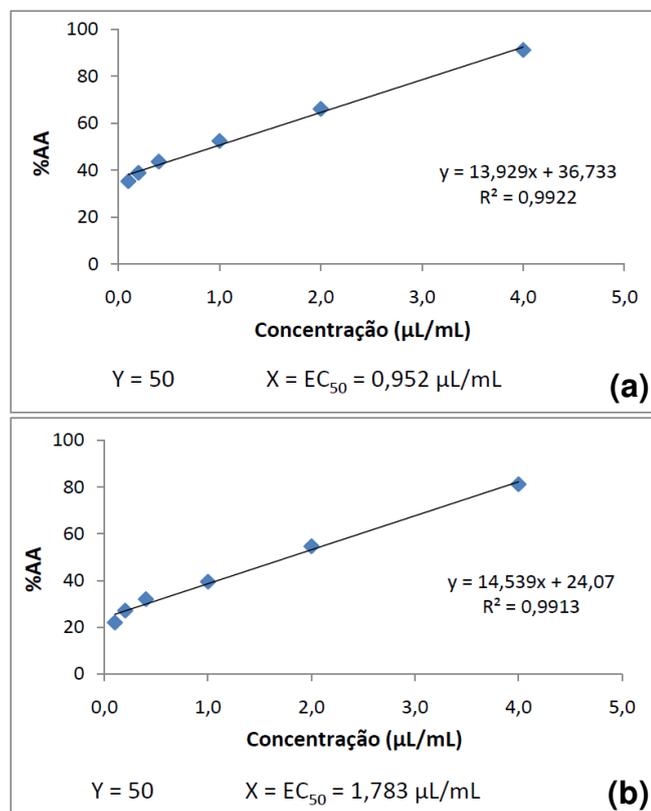


Figura 29 – Cálculo do EC_{50} para os OEEA, (a) manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) e (b) manjerona (*Origanum majorana* L.).

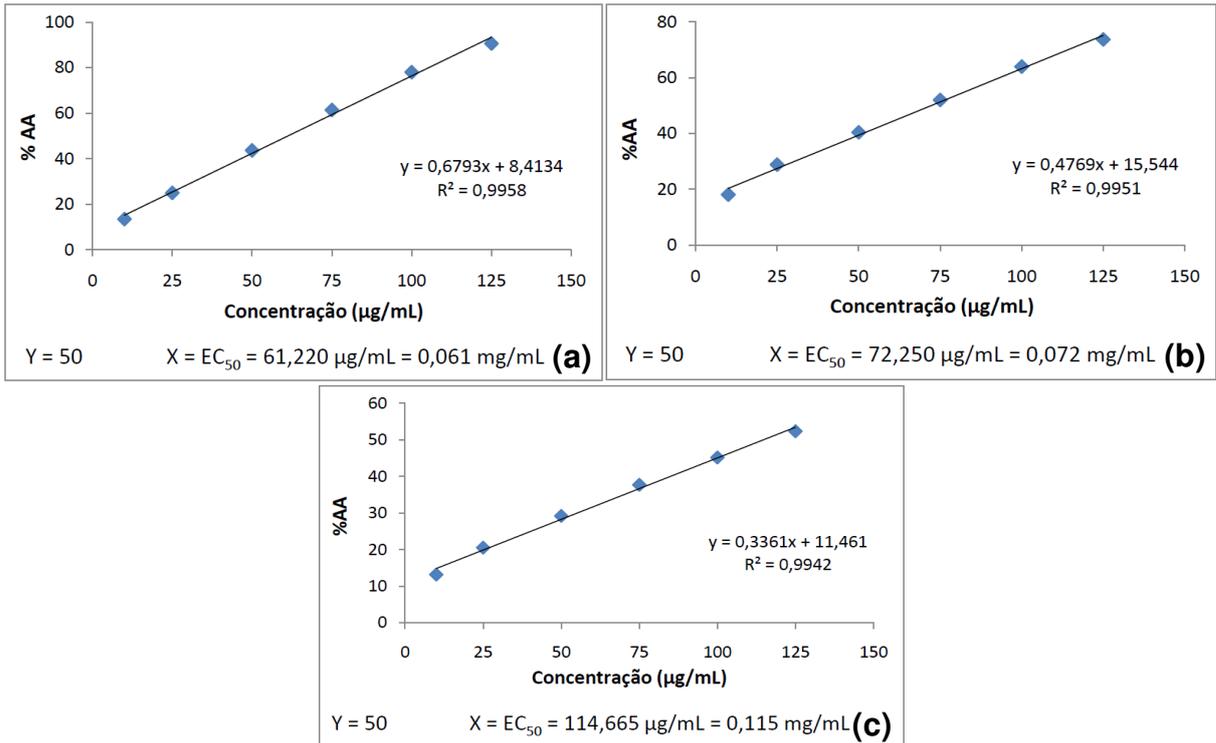


Figura 30 – Cálculo do EC₅₀ para as substâncias de referência, (a) α-tocoferol, (b) BHA e (c) BHT.

Neste estudo, o valor de EC₅₀ encontrado para o extrato etanólico de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) foi de 363,992 µg/mL, sendo que para a mesma planta o valor encontrado por Mariutti et al. (2008), foi de 43 g de manjeriço/Kg de DPPH. No caso da manjerona (*Origanum majorana* L.), o EC₅₀ obtido foi de 472,557 µg/mL, enquanto que Mariutti et al. (2008), obteve um EC₅₀ de 17,84 g de manjerona/Kg de DPPH.

Os valores de EC₅₀ encontrados para as substâncias de referência (BHA, BHT, α-tocoferol) (Tabela 2 e Figura 31) foram menores de que para os EEEA de manjerona e manjeriço, apresentando uma maior capacidade antioxidante, provavelmente devido ao fato de serem substâncias puras, as quais são reconhecidas como antioxidantes comerciais de relativa capacidade de seqüestro de radicais livres. O BHT apresentou a menor capacidade antioxidante entre os padrões analisados. Por outro lado, o padrão α-tocoferol apresentou a maior capacidade antioxidante (menor valor de EC₅₀) entre os padrões e entre os extratos etanólicos das ervas aromáticas. No entanto, os óleos essenciais dessas ervas apresentaram capacidade antioxidante superiores aos padrões BHT, BHA e α-tocoferol. O óleo

essencial de manjeriço e manjerona apresentaram EC_{50} no valor de 0,952 $\mu\text{L/mL}$ e 1,783 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente.

Tabela 2 – EC_{50} dos EEEA, OEEA e substâncias de referência (BHA, BHT, α -tocoferol).

Amostras	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
BHT	114,665 \pm 0,071
BHA	72,250 \pm 0,068
α -tocoferol	61,220 \pm 0,062
EE – Manjerona	472,557 \pm 0,078
EE – Manjeriço	363,992 \pm 0,086
OE – Manjerona	1,783* \pm 0,061
OE – Manjeriço	0,952* \pm 0,087

*concentração em $\mu\text{L/mL}$.

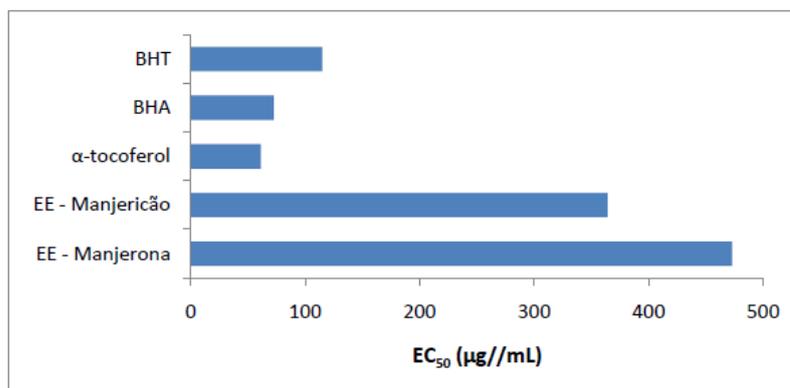


Figura 31 – Atividade antioxidante (EC_{50}) dos EEEA, OEEA e substâncias de referência (BHT, BHA e α -tocoferol).

A atividade de seqüestro do radical livre DPPH• foi também expressa em termos de porcentagem de atividade antioxidante (Tabela 3). Neste estudo, após 80 minutos de reação, os EEEA foram avaliados na concentração de 0,89 mg/mL, os OEEA a 4 $\mu\text{L/mL}$, e as substâncias de referência (BHA, BHT e α -tocoferol) a 125 $\mu\text{g/mL}$. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de Mensor et al. (2001) (Eq.1).

O extrato etanólico (70:30 v/v) de manjerona (*Origanum majorana* L.) apresentou uma porcentagem de atividade antioxidante de 86,90% em uma

concentração de 0,89 mg/mL após 80 minutos de reação, para a mesma planta o valor encontrado por Ravelli (2011) foi de 85,12%, sendo que os extratos etanólicos (80:20 v/v) foram analisados a uma concentração de 5 mg/mL após 45 minutos de reação. No caso do extrato etanólico de manjericão (*Ocimum basilicum* L.), que foi analisado nas mesmas condições que a manjerona, a porcentagem de atividade antioxidante foi de 88,74%, enquanto que Wongsá et al. (2011) encontrou para a mesma planta uma porcentagem de atividade antioxidante de 80,38%, utilizando para a análise extratos aquosos a uma concentração de 0,5 mg/mL e tempo de reação de 30 minutos.

Tabela 3 – Porcentagem de atividade antioxidante das amostras analisadas pelo método do DPPH•.

Amostras	%AA
BHT*	52,37 ± 0,24
BHA*	73,69 ± 0,18
α-tocoferol*	90,52 ± 0,17
EE – Manjerona**	86,90 ± 0,21
EE – Manjericão**	88,74 ± 0,36
OE – Manjerona***	81,15 ± 0,32
OE – Manjericão***	91,20 ± 0,26

*Concentração = 125 µg/mL

**Concentração = 0,89 mg/mL

***Concentração = 4 µL/mL

5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EEEA E OEEA

O manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e a manjerona (*Origanum majorana* L.) são alimentos que, além da qualidade nutricional, possuem compostos fenólicos com atividade antioxidante. Apesar disto, pouco se sabe sobre o seu potencial antimicrobiano. Desta forma, os EEEA foram submetidos à análise de atividade antibacteriana.

Foram utilizados os métodos de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), contra quatro bactérias patogênicas humanas *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Salmonella enteritidis* ATCC 13.076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13.883 e *Bacillus cereus* ATCC 11.778.

A Figura 32 ilustra as bactérias reativadas utilizadas nas análises, sendo que estas foram suspensas em uma solução de soro fisiológico, homogeneizadas e ajustadas para o valor de absorvância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC na escala de Mc Farland (Figura 33). Estas soluções foram utilizadas para inocular meios BHI e ágar nutriente, de modo a obter uma concentração bacteriana de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL, sendo as misturas homogeneizadas e utilizadas para as análises antibacterianas.

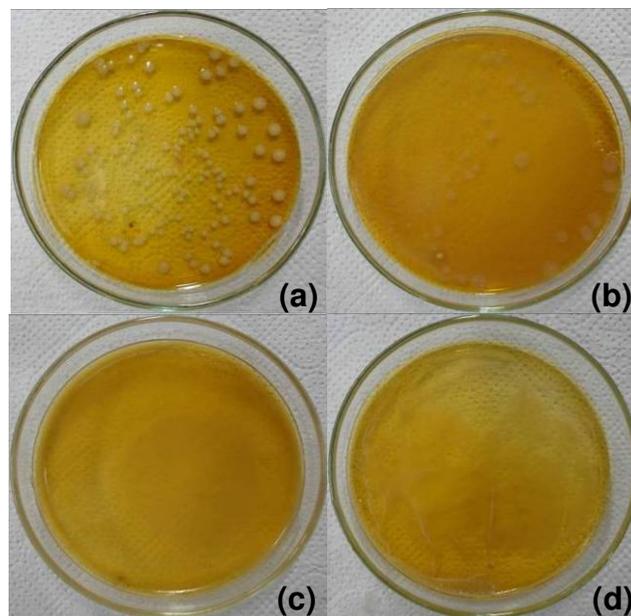


Figura 32 - Bactérias reativadas utilizadas nas análises, (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Bacillus cereus*, (c) *Salmonella enteritidis*, (d) *Klebsiella pneumoniae*.



Figura 33 - Solução de soro fisiológico com bactérias.

A análise de atividade antimicrobiana por difusão em ágar trata-se de uma prova rápida de susceptibilidade a antimicrobianos, essencialmente qualitativa.

A Figura 34 ilustra o teste de difusão em ágar para o manjericão com as bactérias *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, e a Figura 35 para a manjerona, com as mesmas bactérias. Com o *Bacillus cereus* e a *Klebsiella pneumoniae*, não houve ação inibitória para os EEEA e OEEA das duas ervas analisadas. O teste demonstrou que o etanol utilizado nas extrações não apresentou nenhuma ação inibitória, enquanto que a ampicilina, utilizada como controle positivo, apresentou a mesma ação com todas as bactérias utilizadas para a análise, representada nas Figuras 34 e 35 pelas bactérias *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Os extratos etanólicos de manjericão e manjerona não apresentaram inibição contra as bactérias *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*, porém os óleos essenciais das duas plantas em questão inibiram o crescimento das bactérias *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* (Figuras 34 e 35 e Tabela 4).

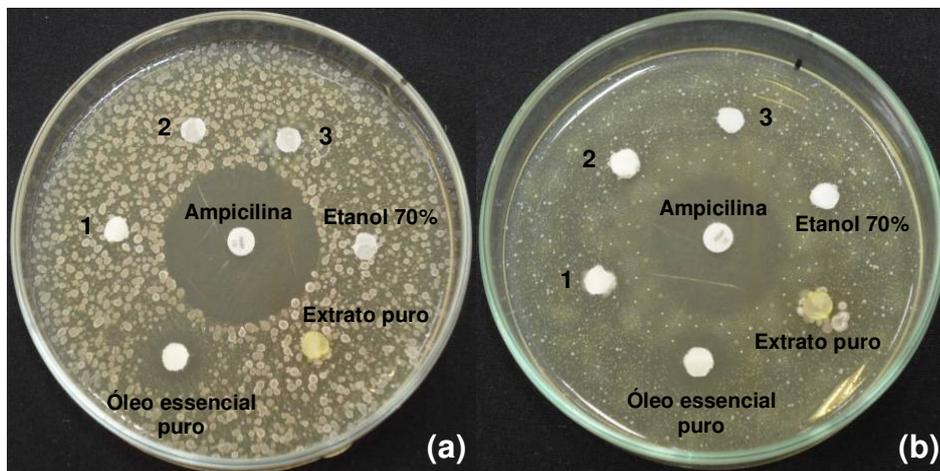


Figura 34 - Teste de difusão em ágar com manjericão, (a) *Salmonella enteritidis* e (b) *Staphylococcus aureus*, onde 1, 2 e 3 são diluições do extrato, 2.133,33 ug/mL, 1.066,67 ug/mL e 533,33 ug/mL, respectivamente.

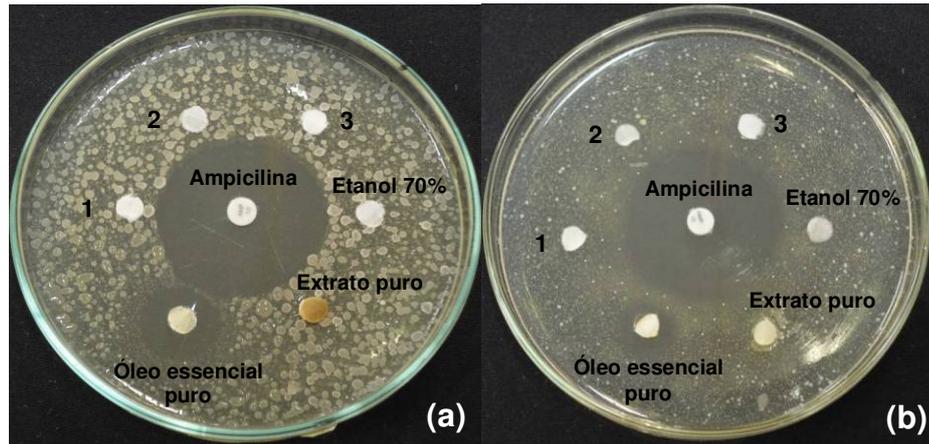


Figura 35 - Teste de difusão em ágar com manjerona, (a) *Salmonella enteritidis* e (b) *Staphylococcus aureus*, onde 1, 2 e 3 são diluições do extrato, 2.133,33 µg/mL, 1.066,67 µg/mL e 533,33 µg/mL, respectivamente.

Tabela 4 – Teste de Difusão em Ágar.

	*Diâmetro do halo de inibição (cm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i> *	<i>Bacillus cereus</i> *	<i>Salmonella enteritidis</i> *	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *
Ampicilina	3,2	3	2,6	3
Etanol 70% (v/v)	0	0	0	0
OE ¹ – puro	0,8	0	1	0
EE ¹ – puro	0	0	0	0
EE ¹ – 2.133,33 µg/mL	0	0	0	0
EE ¹ – 1.066,67 µg/mL	0	0	0	0
EE ¹ – 533,33 µg/mL	0	0	0	0
OE ² – puro	1	0	1,2	0
EE ² – puro	0	0	0	0
EE ² – 2.133,33 µg/mL	0	0	0	0
EE ² – 1.066,67 µg/mL	0	0	0	0
EE ² – 533,33 µg/mL	0	0	0	0

¹ Manjeriçã

² Manjerona

Para a concentração inibitória mínima, os extratos etanólicos de manjerona e manjeriçã, nas concentrações utilizadas, não demonstraram inibição contra as

bactérias deste estudo, havendo crescimento bacteriano em todos os casos. A Figura 36 representa a CIM do EE de manjericão contra *Salmonella enteritidis*, sendo que a mesma resposta foi observada para as outras bactérias utilizadas e para o EE de manjerona.

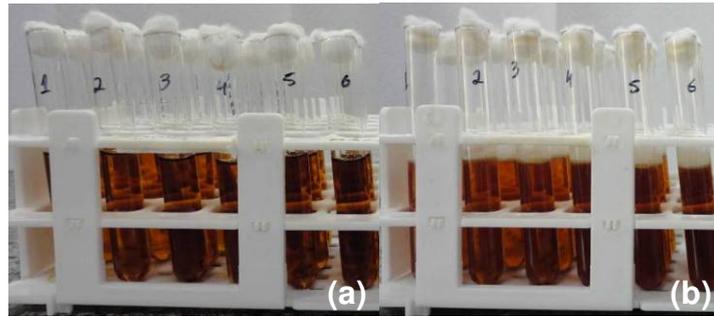


Figura 36 - CIM dos extratos de manjericão com *Salmonella enteritidis*, (a) inicialmente e (b) após 24 horas.

O óleo essencial de manjericão, nas concentrações utilizadas, não demonstrou inibição contra as bactérias deste estudo, havendo crescimento bacteriano em todos os casos. A Figura 37 representa a CIM do OE de manjericão contra *Salmonella enteritidis*, sendo que a mesma resposta foi observada para as outras bactérias utilizadas. Este mesmo resultado foi observado com os OE de manjerona para as bactérias *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*. Entretanto o *Staphylococcus aureus* foi inibido pelo óleo essencial de manjerona nas concentrações de 40 $\mu\text{L/mL}$, 20 $\mu\text{L/mL}$ e 10 $\mu\text{L/mL}$, ou seja, apresentaram absorvância inferior a 0,05 em 660 nm. Desta forma a CIM do óleo essencial de manjerona contra o *Staphylococcus aureus* é de 10 $\mu\text{L/mL}$.

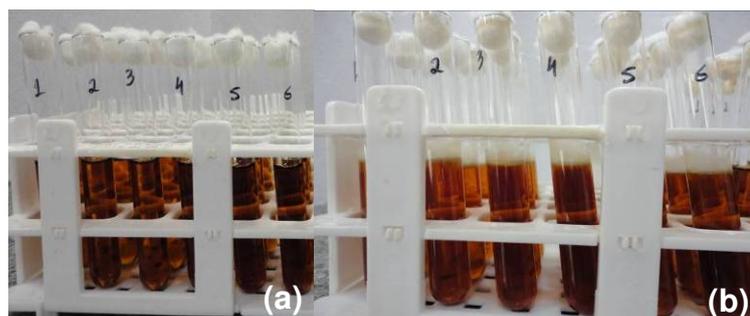


Figura 37 - CIM dos óleos essenciais de manjericão com *Salmonella enteritidis*, (a) inicialmente e (b) após 24 horas.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada somente com os casos positivos da CIM, ou seja, a análise foi realizada com o óleo essencial de manjerona para as concentrações de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sendo que o resultado foi negativo para todas as concentrações, ou seja, houve crescimento bacteriano vivível sobre o ágar após 24 horas (Figura 38).

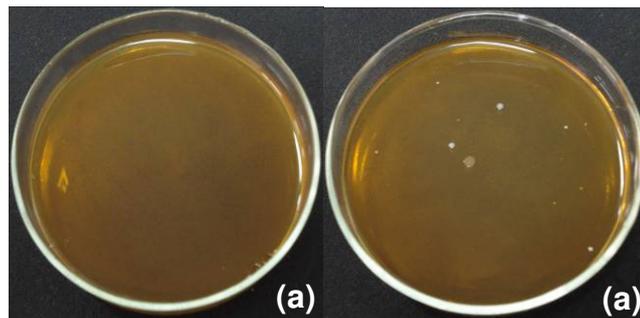


Figura 38 - CBM dos óleos essenciais de manjericão com *Staphylococcus aureus*, (a) inicialmente e (b) após 24 horas.

Estes resultados foram contrários aos encontrados por Busata (2006), o qual analisou a atividade antibacteriana do óleo essencial de manjerona (*Origanum majorana* L.) por difusão em ágar com 20 bactérias. Neste estudo o *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) apresentou um halo de inibição de 2,6 cm, e dentre todas as bactérias analisadas, a única que não apresentou halo de inibição foi a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Este mesmo autor realizou a CIM, sendo igual a 0,782 mg/mL contra o *Staphylococcus aureus*. Martins et al. (2010) analisou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjericão (*Ocimum basilicum* L.) frente a sorogrupos de *Escherichia coli*, encontrando por meio de difusão em ágar uma média de halo de inibição igual a 1,14 cm.

Haida et al. (2007) encontrou em seus estudos realizados com extratos etanólicos 80% (v/v) de oito ervas medicinais, dentre elas manjericão (*Ocimum gratissimum* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.), uma atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* que gerou um halo de inibição igual ou menor a 0,7 cm para o extrato de manjerona, com concentração de 500 mg/mL, e nenhuma atividade para o extrato de manjericão. Conforme Nakamura et al. (1999), o óleo essencial de manjericão possui atividade antibacteriana contra o *Staphylococcus*

aureus, entretanto não houve inibição quando adicionado extrato etanólico. Ele também demonstrou que o óleo essencial desta planta possui atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, mas não contra *Pseudomona aeruginosa*.

Os resultados obtidos neste estudo diferem dos encontrados na literatura, devido ao fato de estar se trabalhando com produtos naturais, cujos constituintes variam conforme as diferentes origens geográficas, condições climáticas, solo, época de plantio e até mesmo horário de colheita.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que as ervas analisadas apresentam um teor significativo de compostos fenólicos e flavonóides totais, sendo que o manjericão (*Ocimum basilicum* L.) apresentou um teor de compostos fenólicos e de flavonóides superiores à manjerona (*Origanum majorana* L.).

Na análise da atividade antioxidante, a mesma tendência citada anteriormente se manteve, tanto para os extratos hidroalcoólicos, quanto para os óleos essenciais, ou seja, o manjericão (*Ocimum basilicum* L.) apresentou %AA = 88,74% para o extrato e 91,20% para o óleo essencial, com EC₅₀ de 363,992 µg/mL e 0,952 µL/mL, respectivamente. No entanto, o extrato etanólico de manjerona (*Origanum majorana* L.) apresentou uma %AA = 86,90% e seu óleo essencial %AA = 81,15%, com EC₅₀ de 472,557 µg/mL e 1,783 µL/mL, respectivamente.

No método de difusão em ágar e CIM, nenhum dos extratos analisados apresentaram inibição contra os quatro microrganismos testados. O óleo essencial puro de manjericão no método de difusão em ágar apresentou um halo de inibição contra dois dos microrganismos testados (*Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*), porém na análise da CIM nas concentrações analisadas não houve inibição contra nenhum dos microrganismos testados. O óleo essencial puro de manjerona também apresentou um halo de inibição contra os mesmos microrganismos que o manjericão. No entanto na análise da CIM este apresentou um resultado positivo para três concentrações, sendo a menor delas 10 µL/mL, e CBM negativa para os três casos. Com base nestes resultados, como trabalho futuro, testaremos outras concentrações de extratos de manjericão para encontramos a sua concentração inibitória mínima.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. E.; TIRZITE, D.; TIRZITE, G.; R00ZEN, J.P. Antioxidant activity of 1,4-dihydropyridine derivatives in β -carotene-methyl linoleate, sunflower oil and emulsions. **Food Chemistry**, v.66, n. 2, p.189-195, 1999.

ALEZANDRO, M. R. **Determinação de isoflavonas e capacidade antioxidante de alimentos industrializados à base de soja e/ou produtos derivados consumidos no Brasil**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos – Área de Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

APAK, R.; GUÇLU, K.; OZYUREK, M.; KARADEMIR, S.E. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and e, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n. 26, p. 7970-7981, 2004.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1995.

ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microorganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 2010. 100 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food Chemistry**, v.112, n. 2, p. 303-309, 2009.

BARATA, L. E. S.; VILHA, A. M.; CARVALHO, R. Mercado de Perfumes e cosmética no Brasil. In: **III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais**, Campinas: IAC, 2005.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, C.; BARROSO, J. G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Journal Flavours Fragrance**, v.13, p.235-244, 1998.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, n. 1, p. 113-123, 2006.

BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A. F. M.; EASA, A. M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. **Food Chemistry**, v.107, n. 4, p. 1636-1641, 2008.

BONANNI, A. Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. **Food Chemistry**, v.102, p. 751-758, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft und –Technologie**. v.22, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. **Resolução - RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007**. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, que consta como Anexo da presente Resolução. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.htm>. Acesso em 18/09/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 04, de 24 de novembro de 1988**. Aprovar a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III, IV e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965, Diário Oficial, Brasília, 19 de dezembro de 1988, Seção I, p. 24716-24723. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cn_s.pdf>. Acesso em 18/09/2011.

BRASIL, Presidência da República. **Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006**. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, 23 jun. 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_N_5813.pdf>. Acesso em: 23/09/2011.

BUSATTA, C. **Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* e em Alimentos dos Extratos de Orégano e Manjerona**. 2006. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões, Erechim, 2006.

CAETANO, A. C. S. **Potencial Antioxidante de Extratos de Resíduos de Acerolas (*Malpighia Emarginata* D. C.) em Diferentes Sistemas Modelos e na**

Estabilidade Oxidativa do Óleo de Soja. 2009. 113 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; BUSATTA, C.; RODRIGUES, M. R. A. R.; OLIVEIRA, J. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Origanum vulgare* em linguça. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 38, n. 4, 2007.

CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de Apis mellifera L. da região Sul do Brasil.** 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), UFPR, Curitiba, 2008.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. **RBAC**, Curitiba, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

COSTA, L. M.; MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E.; TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero *Capsicum*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n. 1, 2010.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais.** Campinas, 2006.

FELTROW, C. W.; ÁVILA, J. R. **Manual de Medicina alternativa para o profissional de saúde.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

FOX, A. **Bacteriologia – Capítulo quatro – Membrana celular, esporos e biossíntese macromolecular,** 2010. Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/chapter_4_bp.htm>. Acesso em: 28/10/2011.

GENENA, A. K. **Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; ALEZANDRO, M. R.; YORN LUI, M. C. Condimentos comerciais e ingredientes industriais: avaliação da capacidade antioxidante e do conteúdo de flavonóides para o desenvolvimento de alimentos funcionais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 31, n. 2, 2011.

GÓMEZ, M. E. D. B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa.** 2003. 149 f. Tese (Doutorado em ciência dos alimentos) – Área de Bromatologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GUERRA, N. B.; LAJOLO, F. M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v. 25, n. 1, p.45-50, 2005.

HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar,** v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HERTOG, M.; FESKENS, E.; HOLLMAN, P.; KATAN, M.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet,** v. 342, p. 1007-1011, 1993.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim. Nutr.,** Araraquara, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.).** 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JORGE, N.; ANGELO, P. M. Efeito antioxidante do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila na estabilidade oxidativa do óleo de girassol. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** São Paulo, v. 67, n. 1, 2008.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.; CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry,** v.100, n. 1, p. 237-240, 2007.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento,** Brasília, p. 18-22, 2003.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. 2002. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Instituto Plantarum, Nova Odessa.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MARIUTTI, L. R. B.; BARRETO, G. P. M.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A. Z. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.51, n. 6, p. 1225-1232, 2008.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae: Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of food Technology**, v.10, p.96-103, 2007.

MARTINS, A. G. L. A.; NASCIMENTO, A. R.; FILHO, J. E. M.; SOUZA, A. G.; ARAGÃO, N. E.; FILHO, N. E. M.; SILVA, D. S. V. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1791-1796, 2010.

MEDINA, A. L. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de araçá (*Psidium cattleianum*)**. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 127-130, 2001.

MURCIA, M. A.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMÉNEZ, A. M.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives, influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p. 1872-1881, 2004.

NAKAMURA, C. V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, 1999.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO R. N. Interference of *Ictranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Rev. Bras. Farmacogn.**, n. 17, p. 186-190, 2007.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.4, p. 1235-1259, 1995.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the phenolic of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1190-1195, 2005.

RABANAL, R. M.; ARIAS A.; PRADO B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ M.; SÁNCHEZ-MATEO C. C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **J Ethnopharmacol**, v. 81, p. 287-292, 2002.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA, E. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. **Journal of Chromatography A**, v.1027, n. 1-2, p. 121-126, 2004.

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

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RESURRECCION, A. V. A.; FRANCISCO, M. L. L. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, v. 117, p. 356-363, 2009.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**, London, v. 2, n. 4, p.152-159, 1997.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudos dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 181 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SERAFINI, L.A.; SANTOS, A.C.A dos; TOUGUINHA, L.A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS, 55p. 2002.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; Phenolic antioxidants. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAN. B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p.759, 2005.

SHIRAHIGUE, L. D. **Caracterização química de extratos de sementes e casca de uva e seus efeitos antioxidantes sobre carne de frango processada e armazenada sob refrigeração**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SILVA, M. L. C.; SANTANA, A. S.; COSTA, R. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

WONGSA, P.; CHAIWARIT, J.; ZAMALUDIEN, A. In vitro screening of phenolic compounds, potencial inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. **Food Chemistry**, v.131, p. 964-971, 2011.