

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

MARCUS VINICIUS PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*), LIMÃO  
SICILIANO (*Citrus limon*), ANIS ESTRELADO (*Illicium verum*) E  
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO  
2016

MARCUS VINICIUS PEREIRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*), LIMÃO  
SICILIANO (*Citrus limon*), ANIS ESTRELADO (*Illicium verum*) E  
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação,  
apresentado à disciplina de Trabalho de  
Conclusão de Curso II, do Curso Superior de  
Tecnologia em Processos Químicos da  
Coordenação de Processos Químicos – COPEQ  
– da Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná – UTFPR, para obtenção do Título de  
Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Shioji Tiومان

TOLEDO  
2016

**TERMO DE APROVAÇÃO  
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

***MARCUS VINICIUS PEREIRA***

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE LIMÃO TAHITI (*Citrus latifolia*), LIMÃO  
SICILIANO (*Citrus limon*), ANIS ESTRELADO (*Illicium verum*) E  
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis*)**

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Shioji Tiومان

---

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Bernardi Wenzel

Toledo, junho de 2016

## AGRADECIMENTOS

*À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi o que me deu esperança para seguir.*

*À UTFPR, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.*

*À professora Dr<sup>a</sup> Tatiana pela paciência, orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.*

*À Munice, por me auxiliar no início do trabalho e por me fornecer confiança para avançar na realização deste trabalho.*

*Aos técnicos Rafael, Daniele, Bruna e Caroline sempre prestativos e dispostos a ajudar no que fosse preciso.*

*Aos colegas, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida, com certeza.*

***Obrigado!***

## RESUMO

PEREIRA, Marcus Vinicius. Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais de limão tahiti (*Citrus latifolia*), limão siciliano (*Citrus limon*), anis estrelado (*Illicium verum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). 2016. 58f. Trabalho de conclusão de Curso – Curso superior de Tecnologia em Processos Químicos, Coordenação de Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2016

A busca complementar por alimentos mais seguros faz surgir a necessidade do uso de conservantes menos tóxicos. Os óleos essenciais estão recebendo uma atenção especial devido suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas e por serem de origem natural. No entanto, deve-se também levar em conta as propriedades organolépticas e a toxicidade dos óleos essenciais escolhidos. Este trabalho avalia as propriedades antibacterianas e antioxidantes dos óleos essenciais comerciais de limão tahiti (*Citrus latifolia*), limão siciliano (*Citrus limon*), anis estrelado (*Illicium verum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). A atividade antibacteriana foi observada pelo método de microdiluição, utilizando-se de placas de microtitulação de 96 cavidades. A atividade antioxidante foi realizada pelo sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e pelo método do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). O óleo essencial de limão apresentou a maior atividade sequestradora de radicais DPPH com  $IC_{50}$  de 264,16  $mg.mL^{-1}$  seguido pelo óleo essencial de anis estrelado e limão siciliano ( $IC_{50}$  de 330,30 e 395,45  $mg.mL^{-1}$ , respectivamente) e o alecrim não apresentou atividade antioxidante em nenhum dos métodos utilizados. Pelo método FRAP o óleo essencial de anis estrelado apresentou a maior atividade seguindo do limão siciliano e depois o limão tahiti. Nenhum dos óleos essenciais apresentou atividade antibacteriana em concentrações iguais ou menores que 20  $mg.mL^{-1}$  contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Bacillus cereus*. Os resultados indicam que os óleos estudados não apresentam aplicabilidade como conservante e sequestrante de radicais, o que pode ser explicado pela ausência de compostos fenólicos na composição dos mesmos.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais. Aditivos alimentares. Concentração Inibitória Mínima. Método FRAP. Método DPPH. Alimentos.

## ABSTRACT

PEREIRA, Marcus Vinicius. Antibacterial and antioxidant activity of lime (*Citrus latifolia*), limon (*Citrus limon*), star anise (*Illicium verum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils. 2016. 58f. Trabalho de conclusão de Curso – Curso superior de Tecnologia em Processos Químicos, Coordenação de Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2016

In the search for safer foods arises the need to use less toxic additives. Essential oils are receiving special attention because of its antioxidant and antimicrobial properties and their natural origin. Nevertheless, one should also take into account the toxicity and organoleptic properties of the chosen essential oils. This paper evaluates the antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils of lime (*Citrus latifolia*), lemon (*Citrus limon*), star anise (*Illicium verum*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). The antibacterial activity was observed by the microdilution method using 96 wells microtiter plates. The antioxidant activity was conducted by the scavenging of DPPH radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) methods. The lime essential oil showed the highest antioxidant activity with an  $IC_{50}$  of  $264.16 \text{ mg.mL}^{-1}$  followed by the essential oil of star anise and lemon ( $IC_{50}$  of  $330.30$  and  $395.45 \text{ mg.mL}^{-1}$ , respectively) rosemary essential oil did not show any antioxidant activity in both methods. By the FRAP method, the star anise essential oil showed the highest activity following the lemon and then lime. None of the essential oils showed antibacterial activity at concentrations equal to or less than  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Bacillus cereus*. The results indicate that the chosen essential oils do not present applicability as a food additive and scavenger of radicals, that can be explained by the absence of phenolic compounds in the composition thereof.

**Keywords:** Essential Oils. Food additives. Minimum Inhibitory Concentration. DPPH Method. FRAP Method. Foods.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos majoritários presentes no óleo essencial das sementes de Anis estrelado.....	34
Tabela 2 - Compostos majoritários do óleo essencial de alecrim.....	35
Tabela 3 - Compostos majoritários do óleo essencial de limão tahiti.....	36
Tabela 4 - Compostos majoritários do óleo essencial de limão siciliano.....	37
Tabela 5 - Resultados da análise de atividade antioxidante pelo método DPPH.....	42
Tabela 6 – Resultados do teste FRAP para as diferentes concentrações de óleos essenciais.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução do radical estável DPPH <sup>+</sup> em DPPH-H.....	20
Figura 2 - Redução do complexo TPTZ.....	21
Figura 3 - Plantas utilizadas nos testes. (A) anis estrelado. (B) alecrim. (C) limão tahiti. (D) limão siciliano.....	24
Figura 4 - Organização dos poços na placa de microtitulação de 96 cavidades para o teste CIM.....	30
Figura 5 - Curva-padrão de sulfato ferroso.....	33
Figura 6 - Estrutura química dos compostos majoritários do anis estrelado.....	35
Figura 7 - Estrutura química dos compostos majoritários do alecrim.....	35
Figura 8 - Estrutura química dos compostos majoritários do limão tahiti.....	36
Figura 9 - Estrutura química dos compostos majoritários do limão siciliano.....	37
Figura 10 – Porcentagem de DPPH residual em função da variação da concentração de óleo essencial. (A) OE de anis estrelado. (B) OE de limão siciliano. (C) OE de limão tahiti.....	41
Figura 11 - Comportamento da absorvância de FRAP em função da variação da concentração de óleo essencial. (A) OE de limão tahiti. (B) OE de limão siciliano. (C) OE de anis estrelado.....	42



## LISTA SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIações.

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{M}$  – Micromolar ( $\mu\text{mol/L}$ )

ABTS<sup>+</sup> - Radical 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHA - Hidroxinisol de butila

BHT - Hidroxitolueno de butila

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DEC – *E. coli* diarreio gênica

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH<sup>+</sup> - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DPPH-H - 2,2-difenilpicril-hidrazina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EFS – Extração com Fluido Supercrítico

HPTLC - Cromatografia em camada fina de elevada performance

ISO – Organização Internacional para Padronização

MHB – *Mueller-Hinton Broth* (Caldo Mueller-Hinton)

mL – Mililitro

mM – Milimolar (mmol/L)

M – Molar (mol/L)

MO – Micro-organismo

OE – Óleos essenciais

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônia por mL

UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-s-triazina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 OBJETIVOS .....	12
1.1.2 Objetivo geral .....	12
1.1.2 Objetivos específicos .....	12
<b>2 ADITIVOS EM ALIMENTOS .....</b>	<b>14</b>
2.2 CONSERVANTES ALIMENTÍCIOS .....	16
2.3 AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	16
2.4 ANTIOXIDANTES ALIMENTÍCIOS .....	17
2.5 AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	19
2.2.2 Óleos essenciais .....	21
2.2.2.1 Anis Estrelado .....	24
2.2.2.2 Alecrim .....	25
2.2.2.3 Limão Tahiti e Siciliano .....	26
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	27
3.2 MATERIAL .....	27
3.2.1 Óleos essenciais .....	27
3.2.2 Micro-organismos .....	27
3.3 MÉTODOS .....	28
3.3.1 Padronização das cepas bacterianas .....	28
3.3.2 Preparo das soluções-teste .....	28
3.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	29
3.3.3 Avaliação da atividade antioxidante .....	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
4.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO .....	34
4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	38
4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	40
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO IV .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As políticas de segurança dos alimentos estão continuamente mudando e os aspectos microbiológicos na qualidade dos alimentos têm sido estudados intensivamente nas últimas décadas. Mesmo em países industrializados, ainda existem altos níveis de infecções alimentares, por exemplo, no Brasil, em 2014, foram notificados 886 casos de infecção alimentar. Com a industrialização dos alimentos, novos riscos estão sendo descobertos, principalmente devido às mudanças na resistência de alguns micro-organismos, nas metodologias de produção, no meio ambiente e ecologia e um aumento global no comércio de produtos alimentícios (HAVELAAR *et al.*, 2010; LANZA, 2015)

Geralmente, as tecnologias eficientes empregadas para aumentar a vida útil dos alimentos reduzem sabor e valores nutricionais. A procura dos consumidores por produtos frescos, saborosos, saudáveis e sadios forçam as indústrias a desenvolver técnicas que, em conjunto com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), protejam e ao mesmo tempo conservam as qualidades iniciais dos mesmos. Sendo assim, constantes inovações estão ocorrendo, como a melhoria das metodologias, de aditivos químicos, dos equipamentos, dos ambientes, entre outros (JAY, 2005; EVANGELISTA, 2007; HAVELAAR *et al.*, 2010; SEETARAMAIAH *et al.*, 2011)

Conservantes e antioxidantes alimentares são aditivos químicos que previnem a contaminação microbiana e oxidação do alimento, respectivamente. Se tornaram essenciais hoje em dia, pois desempenham um papel importante durante o transporte dos alimentos, além de aumentar a vida útil dos mesmos (SEETARAMAIAH *et al.*, 2011). Os conservantes e antioxidantes industriais utilizados apresentam alta toxicidade em doses relativamente baixas. Para tanto, resultados interessantes estão sendo observados na obtenção de novos aditivos químicos conservantes. Uma solução encontrada fora a busca por aditivos de origem natural (HAVELAAR *et al.*, 2010).

Dentre esses, intriga-se sobre conservantes provenientes de plantas aromáticas e terapêuticas, mais especificamente dos óleos essenciais presentes nelas. Os mesmos vêm provando ser uma alternativa realmente eficiente na diminuição da oxidação e micro-organismos alimentares (HAVELAAR *et al.*, 2010; SANTOS, 2010).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.2 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriano e antioxidante de óleos essenciais comerciais de limão tahiti (*Citrus latifolia*), limão siciliano (*Citrus limon*), anis estrelado (*Illicium verum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*).

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* e *Bacillus cereus*.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos óleos essenciais com atividade antibacteriana frente a cepas padrões de *S. aureus*, *E. coli* e *S. enterica* e *B. cereus*.
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de anis estrelado (*I. verum*), alecrim (*R. officinalis*), limão siciliano (*C. limon*), e o limão tahiti (*C. latifolia*) pelo método de sequestro do radical DPPH.
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de anis estrelado (*I. verum*), alecrim (*R. officinalis*), limão siciliano (*C. limon*), e limão tahiti (*C. latifolia*) pelo método FRAP.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos grandes avanços nas tecnologias de controle de micro-organismos patógenos em alimentos, frequentemente se verifica a existência de surtos de doenças transmissíveis por alimentos (DTA). Com o intuito de diminuir a propagação desses micro-organismos, as indústrias geralmente utilizam antimicrobianos para a conservação dos alimentos.

Com o objetivo de diminuir a toxicidade dos alimentos pelo uso de aditivos artificiais cada vez mais poderosos, as indústrias buscam formas naturais de conservação e preservação. O uso de aditivos naturais apresenta-se como uma forma economicamente viável para assegurar a qualidade dos seus produtos (SANTOS, 2010).

De acordo com Burt (2004), vários autores relatam o aumento da resistência microbiana aos antimicrobianos artificiais utilizados na indústria alimentícia como, por exemplo, os ácidos orgânicos fracos e peróxido de hidrogênio. Assim, torna-se importante a busca por novos aditivos alimentícios.

Na busca de novos conservantes, os óleos essenciais recebem notoriedade por serem formados por dezenas de compostos, dos quais aproximadamente 60% apresentam propriedades antifúngicas e 35%, propriedades antibacterianas. Os óleos essenciais em conjunto com antimicrobianos artificiais podem contribuir para a redução da patogenicidade de bactérias resistentes *in vivo*. Os mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais podem incrementar o *modus operandi* dos conservantes usualmente utilizados, reduzindo também, os efeitos colaterais (BURT, 2004; TRAJANO *et al.*, 2009; SANTOS, 2010; BARBOSA, 2011)

Buscar produtos que potencialize o poder antimicrobiano e antioxidante em alimentos tem como finalidade aumentar a qualidade dos mesmos em seu estado de consumo.

## 2 ADITIVOS EM ALIMENTOS

Ao lado do avanço tecnológico na produção de alimentos, o uso de aditivos, que são definidos como “substâncias não nutritivas, com a finalidade de melhorar a aparência, sabor, textura, e tempo de armazenamento”, é frequentemente praticado. São classificados como acidulantes (confere ou intensifica o gosto ácido), espumíferos (altera a tensão superficial); antiúmectante (diminui as características higroscópicas); corante (confere ou intensifica cor) edulcorante (transmite sabor doce); espessante (aumenta a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões); estabilizante (aumenta a estabilidade física das suspensões e emulsões); aromatizante e flavorizante (conferem e intensificam o sabor e aroma); umectante (evita a perda de umidade); antioxidantes (retarda o surgimento de processos oxidativos); e conservadores (impossibilita ou atrasa a deterioração microorgânica ou enzimática) (EVANGELISTA, 2005)

Todos os alimentos são passíveis de se deteriorarem, sendo o grau de alteração relacionado a diversas causas ligadas à composição, presença de enzimas deteriorantes, micro-organismos, e outros fatores (ARAÚJO, 2010). A microbiologia de alimentos está associada a três aspectos: à preservação dos alimentos pelo emprego de micro-organismos; à detecção e prevenção de intoxicações e infecções produzidas pela ação de micro-organismos em alimentos; e o controle da transmissão através dos mesmos. Os micro-organismos (MO) são as formas de vida mais difundidas da natureza. A sua presença tem efeitos tanto negativos quanto positivos para a vida humana, assim o seu controle é fundamental para que se evitem consequências indesejáveis. Os contaminantes microbiológicos, principalmente os bacterianos, são os principais agentes causadores de infecções alimentares (JAY, 2005; EVANGELISTA, 2007; ARAÚJO, 2010; SANTOS, 2010).

Ao lado de MO deteriorantes, existem as espécies patogênicas que podem contaminar os alimentos e transmitir doenças. Doenças essas que podem ser ocasionadas por MO que usam o alimento como meio de transmissão – por exemplo, a cólera e a febre tifoide – e aqueles que usam o alimento como meio de crescimento e podem causar infecções alimentares. As intoxicações alimentares ocorrem quando certas toxinas já elaboradas por micro-organismos são ingeridas juntamente com o alimento (JAY, 2005; SEETARAMAIAH *et al.*, 2011). Os MO patogênicos mais comumente encontrados são os coliformes de origem fecal, estafilococos e *Salmonella*.

Os coliformes de origem fecal são representados por bactérias originárias tanto do trato intestinal humano quanto animal. São bactérias Gram-negativas, aeróbicas e aeróbicas facultativas. Aproximadamente 10% das cepas de *Escherichia coli* são patogênicas as quais podem causar infecções intestinais (DEC – *E. coli* diarreio gênica) e infecções extra intestinais (EVANGELISTA, 2007; SANTOS *et al.*, 2009). Este grupo inclui três gêneros: a *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* sendo as duas últimas não fecais. Por este motivo o gênero *E. coli* é mais conhecido e suas cepas são utilizadas para indicar contaminação fecal em alimentos processados (GEUS; LIMA, 2005)

Estafilococos (em latim *Staphylococcus*) são micro-organismos mesófilos que podem produzir enterotoxinas resistentes a uma ampla variação térmica. Em alimentos, as espécies de maior importância são *S. hyicus*, *S. chromogenese*, *S. intermedius* e *S. aureus* sendo a última a principal espécie associada nos casos de intoxicação alimentar, responsável por aproximadamente 98% dos casos (JAY, 2005; EVANGELISTA, 2007; SANTANA *et al.*, 2010).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, classificado como Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos. São subdivididos em *Salmonella enterica*, responsável por aproximadamente 99,5% dos sorotipos isolados, e *Salmonella bongori*. A grande maioria das salmoneloses causam efeitos leves não necessitando a utilização de antibióticos na terapia, sendo caracterizadas por febre, cólicas abdominais e diarreia. Entretanto há casos extremos em que é necessária a administração de antibióticos, pois esses podem levar à morte (SILVA; DUARTE, 2002).

Ao lado do processo microbiológico de degradação, o processo oxidativo que ocorre em alimentos, representado principalmente pela degradação de óleos e gorduras e alimentos gordurosos, é responsável por alterações químicas que resultam na diminuição da qualidade e valor nutricional dos produtos, e a possível geração de substâncias indesejáveis que podem ser prejudiciais à saúde humana. Para evitar tal processo, a técnica mais eficaz utilizada nos alimentos que são passíveis a tal deterioração é a adição de substâncias antioxidantes que são capazes de retardar ou inibir o processo oxidativo e aumentar o tempo de prateleira e prevenir a diminuição da qualidade dos mesmos (MORAIS *et al.*, 2006).

Além de retardar a degradação oxidativa dos alimentos, acredita-se que a ingestão de compostos antioxidantes presentes em alimentos gera efeito quimiopreventivo através de vários mecanismos que conduzem ao controle sobre o ciclo,

crescimento e proliferação de células. Os antioxidantes apresentam atividade contra a multiplicação de células cancerígenas, facilita a desativação de células cancerígenas, previnem e aliviam a síndrome metabólica (i.e., obesidade, hipertensão, e doença cardiovascular aterosclerótica), possuem atividade contra doenças neurodegenerativas (i.e., doenças de Alzheimer e Parkinson), entre muitas outras (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

## 2.2 CONSERVANTES ALIMENTÍCIOS

Os processos de deterioração, apesar dos diferentes meios de preservação e conservação existentes, ainda são desafiadores para os que produzem e industrializam alimentos. Diante deste fato são utilizados vários métodos de conservação, entre os quais os aditivos químicos, substâncias capazes de retardar a deterioração de produtos alimentícios, protegendo-os contra a ação de micro-organismos ou enzimas, aumentando assim o período de vida útil do alimento (EVANGELISTA, 2007).

Uma maior qualidade de ingredientes, com uma menor contagem microbiana possível, deve ser usada. Conservantes químicos sintéticos são muito utilizados em alimentos, porém muitos deles podem apresentar atividade carcinogênica e/ou teratogênica. Assim, deve-se cada vez mais levar em consideração o tipo de conservante utilizado na preservação dos alimentos (PEREIRA *et al.*, 2008; POLÔNIO; PERES, 2009; SANTOS, 2010).

Segundo o regulamento técnico da ANVISA para produtos saneantes com ação antimicrobiana (RDC nº 14/2007), para ser considerado antimicrobiano alimentício, o produto deve ser eficaz contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. (ANVISA, 2007).

## 2.3 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana e antifúngica. Os ensaios mais utilizados para determinar a Concentração Inibitória



Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) são o de difusão em ágar e de diluições seriadas. Variações referentes à determinação do CIM podem ocorrer devido a diversos fatores. Dentre eles, pode-se citar a técnica utilizada, o micro-organismo e a cepa utilizada, a origem do antimicrobiano, entre outros. O método mais utilizado para determinar CIM é o de diluição em caldo (JAY, 2005).

Os métodos de diluição em caldo consideram a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. Sendo, a avaliação, comparada frente a um padrão biológico de referência, geralmente realizando-se ensaios de turbidez. Este método oferece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Podem-se empregar dois tipos, o macro e micro. A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, que utiliza entre 1,0 e 10,0 mL de meio de cultura e é trabalhoso utilizar essa técnica, pois requer muito espaço laboratorial, gera grande quantidade de resíduos, consome muito tempo, e é de baixa replicabilidade. A técnica de microdiluição utiliza placas de microtitulação com 96 poços, e volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (PINTO, 2010).

## 2.4 ANTIOXIDANTES ALIMENTÍCIOS

Antioxidantes de grande importância para a preservação da qualidade de alimentos, especialmente os que contenham lipídios. A peroxidação lipídica é a principal causa de deterioração nos alimentos graxos, sendo responsável pela alteração de sabor e odor, perda de nutrientes, o que resulta na rejeição e/ou depreciação pelos consumidores. A oxidação e decomposição pode ser iniciada por radiação química, processos térmicos, absorção de raios gama e/ou por iniciação química com íons metálicos e metalproteínas. A técnica de adição de antioxidantes vem sendo utilizada com sucesso pela indústria e atualmente é a mais recomendada para combater a oxidação lipídica (ALVES *et al.*, 2010; MIRANDA, 2010). Os antioxidantes presentes nos alimentos crus são geralmente perdidos durante o processamento ou armazenamento, sendo assim, antioxidantes exógenos são adicionados intencionalmente para proporcionar estabilidade aos produtos e/ou compostos oxidantes (SHAHIDI;

ZHONG, 2010). O que justifica o atual interesse na busca de novas substâncias antioxidantes.

Antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem a velocidade de oxidação, através de diferentes mecanismos como, i.e., inibição de radicais livres e complexação de metais. Esses podem ser classificados como antioxidantes primários (compostos fenólicos que doam átomos de hidrogênio aos radicais livres, e os inativando ou removendo, impedindo as reações em cadeia) como os polifenóis (BHA e BHT) sintéticos e tocoferóis naturais; antioxidantes removedores de oxigênio (capturam o oxigênio do meio por intermédio de reações químicas estáveis, tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação), como o ácido ascórbico, seus isômeros e derivados; antioxidantes biológicos (que podem retirar o oxigênio e/ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício), como enzimas (glicose oxidase e catalases); antioxidantes quelantes (complexam ions metálicos, principalmente ferro e cobre, que catalisam a oxidação lipídica) como o ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de EDTA; antioxidantes mistos (incluem compostos provenientes de plantas e animais); e antioxidantes sinergistas (tem pouca atividade antioxidante, porém aumentam a atividade dos antioxidantes primários quando em associação, atuando sinergisticamente) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Na busca por antioxidantes, alguns critérios foram selecionados, como: não provocar efeitos indesejáveis na cor, odor, sabor e outras características organolépticas; apresentar compatibilidade com o alimento, estabilidade nas condições de processo e armazenamento do alimento, ser não-tóxico mesmo em doses muito acima de sua eficácia, apresentar eficiência e estabilidade em baixas concentrações (entre 0,001% e 0,02%) à altas e baixas temperaturas, lipossolúveis, e serem baratos. Os antioxidantes são geralmente adicionados ao alimento diretamente como aditivos ou indiretamente na difusão ao produto sendo embalado (MIRANDA, 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais e para ser utilizados em alimentos devem ser seguros para a saúde. Alguns antioxidantes sintéticos de maior uso são o hidroxinisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destaca-se o ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno e vitamina E. Os compostos fenólicos, presentes em vegetais, são antioxidantes poderosos, que podem agir tanto como redutores de oxigênio singlete, como na quelação de metais (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). São substâncias químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, englobando desde as formas simples até as poliméricas, essas substâncias interagem

preferencialmente com o radical peroxil por ser mais prevalente na etapa da autoxidação e possui menor energia que outros radicais (ANGELO; JORGE, 2007).

A atividade antioxidante de extratos de plantas é altamente dependente da composição dos extratos e das condições do sistema-teste. Essa atividade está intimamente associada aos compostos fenólicos e concentração total de flavonoides. Os extratos com atividade provada são geralmente compostos por boa parte de fenóis, como os tocoferóis, com o efeito sinérgico de ácidos orgânicos, carotenoides e taninos (CHENG-HONG YANG, 2012).

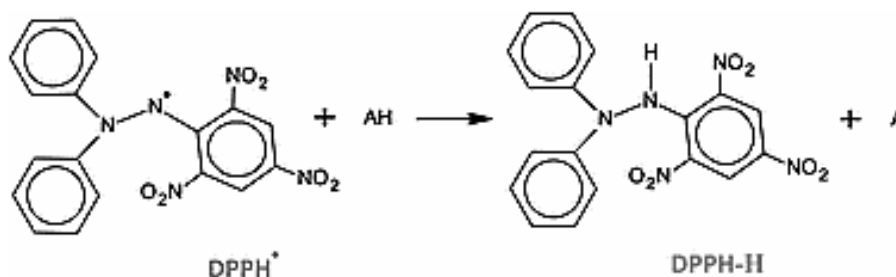
## 2.5 AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Há na literatura diversas metodologias para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente e quimicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos a outros mais complexos com diferentes técnicas instrumentais. Infelizmente, devido aos tipos diferentes de radicais livres e suas diferentes atuações nos organismos vivos, incertamente existira um método simples e universal onde a atividade oxidante possa ser quantificada e medida precisamente. Esses testes podem ser divididos em dois grupos, aqueles que avaliam a peroxidação lipídica, onde um lipídio ou substrato lipoproteico sob condições padrão é usado e o grau de inibição da oxidação é medido; e os ensaios usados para avaliar a habilidade do sequestro de radicais livres (ALVES *et al.*, 2010).

As técnicas mais utilizadas são o sequestro do radical DPPH, método ABTS, o método da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, método FRAP, e ensaios fluorométricos.

O método de sequestro do radical DPPH proposto inicialmente por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) consiste na redução por antioxidantes doadores de hidrogênio do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH<sup>+</sup>) de coloração púrpura formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) de coloração amarela. O desaparecimento da coloração, medido a 517 nm, é estequiometricamente proporcional ao grau de redução e o DPPH restante, é inversamente proporcional à atividade de captura do radical pelo antioxidante. Após a adição de substâncias com atividade antioxidante, essas reduzem o DPPH tornando a solução amarelada, na ausência de

atividade antioxidante, não há a mudança de coloração, sendo assim, quanto maior a atividade antioxidante, maior a descoloração da solução (Figura 1).



**Figura 1 - Redução do radical estável DPPH<sup>+</sup> em DPPH-H.**

Fonte: (PYRZYNSKA; PEKAL, 2013)

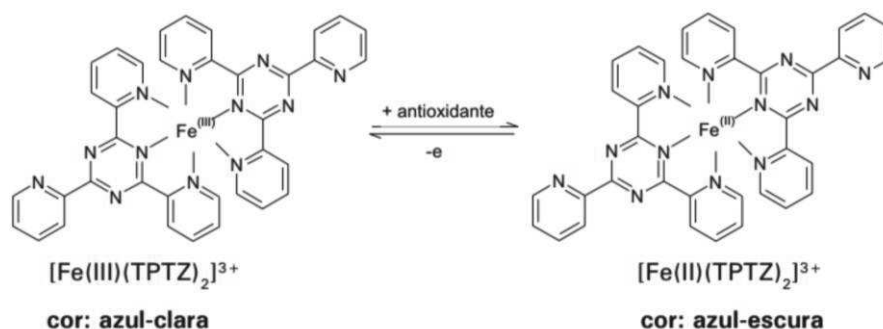
O método ABTS baseia-se na geração do radical 2,2-azino-bis-3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) que deve ser gerado por reações enzimáticas ou químicas. Este método baseia-se na geração do ABTS<sup>+</sup> de coloração azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com o persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante, o ABTS<sup>+</sup> é reduzido em ABTS ocorrendo a perda da coloração. A porcentagem de redução é determinada por um padrão, geralmente Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. É um método simples, que funciona em diferentes faixas de pH e é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (SOUZA, 2013).

O método do branqueamento do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade dos antioxidantes em inibir os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, protegendo um substrato da oxidação, na presença de antioxidantes.

O método de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power* - Poder Antioxidante de redução do Ferro) mede a redução férrica em presença de um antioxidante de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) para um produto de coloração azulada (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) (Figura 2) (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012).

A Espectroscopia por fluorescência é uma técnica que combina alta sensibilidade sem a perda de especificidade e precisão. Devido à essas vantagens, a análise por fluorescência, com o uso de quimio e bioluminescência, tem sido

amplamente utilizada na busca por antioxidantes de fontes naturais, o que originou vários métodos que auxiliam na seleção e avaliação de substâncias bioativas. Dentre esses métodos estão o sequestro do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sequestro do radical peroxil (Método ORAC), sequestro do ácido hipocloroso, entre outros (ALVES *et al.*, 2010).



**Figura 2 - Redução do complexo TPTZ.**

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

### 2.2.2 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OE) podem ser definidos como óleos voláteis, odoríferos e de origem vegetal. São produzidos do metabolismo secundário de plantas aromáticas e em plantas vivas uma ou todas as partes da planta podem conter os óleos essenciais, como as folhas, flores, sementes, brotos, frutos, raízes etc. Análises desses óleos mostram muitas diferenças nas funções orgânicas dos compostos constituintes, existe uma maior abundância de terpenoides e compostos fenólicos, estão presentes também hemiterpenos, monoterpenos e seus derivados (BURT, 2004; JAY, 2005; TROMBETTA *et al.*, 2005; RIBEIRO, 2011).

Na natureza os OE são utilizados como uma importante forma de proteção das plantas, atuando como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros por alterar as propriedades odoríferas, tal como podem atuar atraindo insetos que polinizam e dispersam sementes. Os OE extraídos podem variar em qualidade e quantidade devido a muitos fatores, como o tipo de extração e os fatores ambientais (SILVA, 2010). Muitos são os tipos de extração destes, como, por exemplo,

a hidrodestilação, expressão, por fluido supercrítico (EFS), entre outros. Para cada tipo de propósito de utilização deve-se levar em conta o tipo de extração como, por exemplo, para fins alimentícios é recomendada a extração por calor ou por expressão e para fins estéticos recomenda-se a extração por solventes orgânicos e algumas vezes por dióxido de carbono supercrítico (BAKKALI *et al.*, 2008).

Segundo Burt (2004), os óleos podem conter dezenas de componentes individuais, incluindo compostos majoritários que podem representar até 90% e outros minoritários em que se apresentam apenas como um traço. As plantas das quais são obtidos os óleos essenciais podem possuir diversos tipos de quimiotipos. Um quimiotipo de óleo essencial é derivado de uma planta com mesmas características físicas e visuais, mas sua composição química é diferente. Cada quimiotipo têm diferentes propriedades terapêuticas, devido à presença de diferentes componentes químicos como, por exemplo, um teor fenólico maior em comparação a outro que pode ter alto teor de terpenoides (JAY, 2005).

Para os seres humanos, os OE ou alguns dos seus componentes têm os mais diversos tipos de utilidade como, por exemplo, em perfumes, na alimentação, agricultura, produtos sanitários, entre outros (BURT, 2004). As propriedades antimicrobianas dos OE têm sido intensivamente estudadas devido ao aumento da demanda de conservantes em alimentos. Muitos óleos essenciais já são usados na indústria alimentícia como agentes sensoriais e alguns são utilizados para diminuir a atividade microbiana (SILVA *et al.*, 2011).

Existem evidências em que os compostos minoritários têm um papel crítico na atividade antibacteriana, possivelmente por produzir efeito sinérgico com outros componentes, o que foi evidenciado em estudos com sálvia e certas espécies de tomilho (BURT, 2004). Silva (2010) cita que são os compostos ativos encontrados em algumas plantas que são responsáveis pela ação antimicrobiana como, por exemplo, o eugenol, o isoeugenol, o terpinen-4-ol, timol e carvacrol.

Os mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais não são inteiramente conhecidos devido à grande quantidade de compostos (SILVA *et al.*, 2011). Trombetta *et al* (2005), cita que os efeitos tóxicos produzidos nas membranas são geralmente utilizados para explicar a sua ação antimicrobiana. O que ocorre devido ao caráter lipofílico dos OE, por exemplo, os monoterpenos buscam preferencialmente a partição aquosa das membranas, resultando numa expansão desta, aumentando assim, a

permeabilidade e fluidez, desta maneira ocorre uma perturbação na membrana proteica, inibição da respiração e alteração do transporte iônico.

Outra propriedade biológica dos óleos essenciais que tem atraído grande interesse é a atividade antioxidante, pois pode proteger os alimentos dos efeitos tóxicos dos oxidantes. A atividade antioxidante de vários óleos essenciais vem sendo documentada, apresentam atividade como complexantes, redutores (baseado na redução dos íons férricos), remoção de radicais livres, entre outros. Alguns trabalhos enfatizam que os compostos minoritários presentes nos óleos atuam sinergicamente, pois os principais moléculas, quando usadas como referência, apresentam atividades menores (MIGUEL, 2010).

Ruberto e Baratta (2000) avaliaram a atividade antioxidante de 98 componentes puros que comumente estão presentes em óleos, separados por 30 hidrocarbonetos monoterpenos, onde apenas três componentes (terpionoleno,  $\alpha$ -terpineno, e  $\gamma$ -terpineno) apresentaram alta atividade; 34 monoterpenos oxigenados que apresentaram boa atividade, principalmente devido à presença de diferentes grupos funcionais (álcoois, aldeídos e cetonas); hidrocarbonos sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados que apresentaram baixa ou nenhuma atividade; derivados de benzeno, onde os compostos fenólicos apresentaram alta atividade antioxidante; concluindo que esses compostos atuam principalmente como antioxidantes primários.

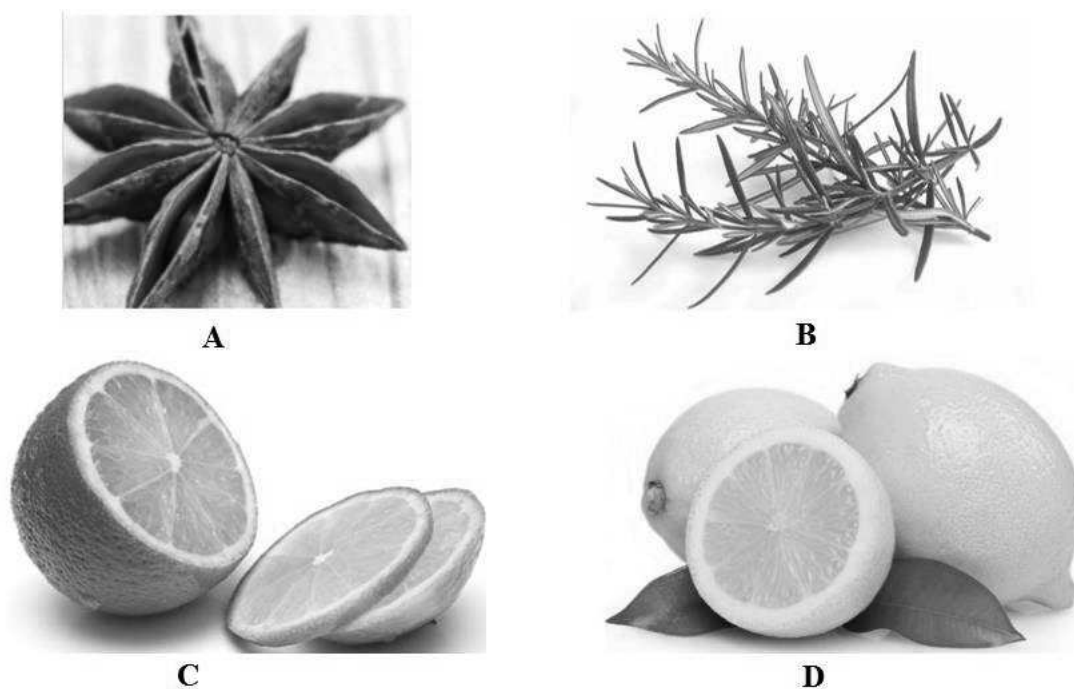
Em um estudo que avaliou a atividade antioxidante de diferentes espécies de Cróton, que são plantas subarborescentes e caducifólias do nordeste brasileiro cujas folhas emitem aromas que lembram uma mistura de erva-doce e cravo-da-índia, concluiu que a atividade antioxidante desses óleos deve-se principalmente pela presença em sua constituição de várias substâncias com atividade antioxidante já documentada, como o E-anetol, metileugenol, e outros com atividade antioxidante baixa porém atuam como sinérgicos, como o 1,8-cineol e E-cariofileno (MORAIS *et al.*, 2006).

Amorati, Foti; Valgimigli (2013), publicaram uma revisão sobre a atividade antioxidante de óleos essenciais e selecionaram estudos previamente publicados sobre a atividade de diferentes óleos essenciais e observaram desde óleos essenciais que apresentam atividade melhor que de antioxidantes sintéticos como o orégano e tomilho, outros que são comparáveis aos sintéticos, i.e. cravo, e outros de baixa atividade, como o alecrim, anis verde, menta, entre outros. No entanto, eles concluíram que os métodos de análise ainda são dispersos, sendo necessário uma aproximação mais padronizada e racional no *design* de experimentos para que os dados possam ser comparados entre os

diferentes grupos de pesquisa e facilite a aplicação dos óleos essenciais na preservação de alimentos.

Em um estudo conduzido por Saleh *et al.* (2010) na avaliação da capacidade antioxidante de 248 óleos essenciais usando do método espectrofotométrico DPPH constatou-se que apenas 7% dos óleos testados apresentaram alta atividade antioxidante e por análise de cromatografia em camada fina de elevada performance (HPTLC) desses óleos essenciais indicam que a atividade antioxidante é apenas associada a alguns compostos químicos ativos, identificados por monoterpenóides oxigenados, monoterpenos fenólicos e hidrocarbonetos monoterpenos.

Os óleos essenciais escolhidos foram os das plantas anis estrelado, alecrim, limão tahiti e limão siciliano (Figura 3A-D)



**Figura 3 - Plantas utilizadas nos testes. (A) anis estrelado. (B) alecrim. (C) limão tahiti. (D) limão siciliano.**

**Fonte: (LASZLO, 2016)**

#### 2.2.2.1 Anis Estrelado

O anis estrelado (Figura 3A) é uma planta pertencente à família das *Magnoliaceae* e é originária das zonas tropicais e subtropicais da Ásia. Sua árvore pode



chegar a até 10 metros de altura com folhas largas de verde muito intenso e que produzem pequenas flores amarelas. A principal característica dessa planta é a produção de um fruto em formato de estrela, onde em cada ponta existe uma semente, que possui marrom e um forte aroma característico sendo rico em óleos essenciais (PRADO, 2013).

Há, na literatura, trabalhos reportando que o óleo essencial desta planta possui funções antibacteriana, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante e antifúngica (DE *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2010; ALY *et al.*, 2014). Normalmente, seu óleo é obtido por extração com fluido supercrítico (EFS) e extração por destilação a vapor das frutas e sementes e apresenta-se como um líquido límpido de coloração amarelo claro e odor fresco, doce e herbáceo. Apresenta como composto majoritário o anetol com até 90% da sua composição, e outros como o limoneno, linalool e o  $\alpha$ -pineno (LASZLO, 2016).

#### 2.2.2.2 Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) (Figura 3B) pertence à família das *Lamiaceae*, é um arbusto perene que pode atingir até 2 metros de altura e possui caule lenhoso e muito ramificado (VAZ; JORGE, 2006). É nativo da região mediterrânea, crescendo em diversos tipos de solos, em áreas de até 2.800 m. de altitude. Os principais produtores são a Espanha, Tunísia, Marrocos, Portugal, Turquia e Índia (JÚNIOR, [s.d.]

É uma planta arbustiva, muito ramificada que pode alcançar até 1,5 metros de altura. Suas hastes são lenhosas e as pequenas folhas são lineares, sempre verdes nas partes superiores e esbranquiçadas no verso com pelos finos e curtos. Floresce o ano todo, com flores axilares que podem ser róseas, roxas, azuis ou brancas (PATRO, 2015).

Contém entre 10 e 25 mL.kg<sup>-1</sup> de óleo essencial, o qual é composto principalmente por 1,8 cineol (30-35%), de cânfora (14-16%), e pineno (20-23%) (LASZLO, 2016).

### 2.2.2.3 Limão Tahiti e Siciliano

Limão é uma importante planta medicinal da família *Ruteaceae*, ela apresenta atividade anticancerígena e bastante potencial antibacteriano dos extratos de diversas partes (folhas, raízes, flores e hastes). Seu óleo essencial é comumente utilizado por indústrias de bebidas, cosméticos, essências aromáticas e alimentos. A composição de cada biotipo de limão difere muito (DHANAVADE, M. J.; JAKULTE, C. B.; GHOSH, J. S.; SONAWANE, 2011).

O óleo essencial da casca é um produto altamente valorizado, com uso amplo na indústria farmacêutica e de refrigerantes (SEBRAE, 2016). Seus óleos essenciais são obtidos por extração à frio das cascas (*peel oil*). As cascas das frutas *Citrus* são uma fonte rica de flavonoides, esses podem atuar diretamente como antioxidantes, com capacidade de alterar as atividades enzimáticas e inibir a proliferação celular (BURT, 2004)

O OE do limão Tahiti (Figura 3C) é composto por limoneno (50-55%), pineno (15-20%) e cimeno (6-9%). O OE do limão siciliano (Figura 3D), é constituído majoritariamente de limoneno (60-70%),  $\gamma$ -terpineno (7-10%), e  $\beta$ -pineno (8-12%) (LASZLO, 2016).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de microbiologia, e química orgânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR câmpus Toledo.

#### 3.2 MATERIAL

##### 3.2.1 Óleos essenciais

A seleção desses dos OE foi baseada pela sua composição e propriedades sensoriais, tão quanto sua utilização no dia-a-dia. Os OE utilizados nesse trabalho foram adquiridos da empresa LASZLO Aromaterapia Ltda (CNPJ 07.997.093/0001-10 com registro na ANVISA N° 2.04.758-2 autorizado em 25/08/2008), a qual fornece óleos essenciais 100% puros com laudos técnicos de composição e livres de adulteração. Foram usados os seguintes óleos: Anis estrelado – *Illicium verum* (Lote 2160); Alecrim – *Rosmarinus officinalis* (Lote 0001); Limão Tahiti – *Citrus latifolia* (Lote 2345); e Limão Siciliano – *Citrus Limon* (Lote 2176).

##### 3.2.2 Micro-organismos

Foram utilizadas cepas-padrão gram-positivas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), e gram-negativas de *Salmonella enterica* sorovar Typhi (ATCC 14458) e *Escherichia coli* (ATCC 10536) obtidas liofilizadas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

### 3.3 MÉTODOS

#### 3.3.1 Padronização das cepas bacterianas

A padronização das cepas bacterianas foi realizada seguindo a metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias presente na norma M7-A6, vol. 23, n° 2 (CLSI, 2003).

Essa metodologia utiliza um controle de turbidez de Sulfato de Bário ( $\text{BaSO}_4$ ), o qual equivale à uma solução padrão de 0,5 McFarland, equivalente à  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de colônia por mililitro ( $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Essa solução é preparada adicionando 0,5 mL de Cloreto de Bário ( $\text{BaCl}_2$  – Vetec)  $0,048 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  em 99,5 mL de Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  – Alphatec)  $0,18 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  em um tubo de ensaio. Após o preparo, agitou-se constantemente a solução para manter em suspensão. Em seguida, realizou-se a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 625 nm obtendo-se uma absorbância de 0,096. Finalmente, a solução foi transferida para tubos de ensaio em volumes de 5 mL e protegidas da luz com papel alumínio.

As cepas bacterianas foram repicadas selecionando-se as cinco colônias melhores isoladas, do mesmo tipo morfológico de cultura em Mueller-Hinton Ágar (MHA – Himedia). Transferiu-se os MO para um tubo contendo 5 mL de Mueller-Hinton Caldo (MHB - Himedia) e em seguida, foi incubada estufa BOD (marca Tecnal modelo TE-371) em ar ambiente à  $35^\circ\text{C}$  por um tempo de 24 horas. A padronização foi realizada ajustando-se a turbidez das suspensões bacterianas com solução salina ( $\text{NaCl}$  - Proquímios) 0,85% previamente esterilizada, ficando visualmente comparável à solução padrão de 0,5 McFarland. Posteriormente realizou-se diluições de 1:20 (50  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana e 950  $\mu\text{L}$  de MHB), obtendo-se uma solução com aproximadamente  $0,75 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  para a realização dos testes.

#### 3.3.2 Preparo das soluções-teste

Para os testes microbiológicos, as soluções-teste foram preparadas em microtubos de centrifuga com volume utilizável de 1 mL, onde, em cada unidade,

pesou-se 40 mg de cada OE, seguido pela adição de 100 uL de Dimetilsulfóxido (DMSO - Nuclear) e posteriormente 900 uL de MHB, tendo por fim uma concentração inicial de 40 mg.mL<sup>-1</sup> de OE .

Para os testes de antioxidantes foram pesadas alíquotas de 50, 40, 30, 20, 10 e 5 mg em microtubos e posteriormente diluídos em 1 mL de metanol para o teste DPPH e 1 mL de água destilada para o teste FRAP, tendo, por fim, concentrações de 50, 40, 30, 20, 10 e 5 mg.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi obtida seguindo a metodologia de microdiluição modificada, a qual foi padronizada pela norma M7-A6 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Utilizando-se de placas de microtitulação estéreis, descartáveis e com um total de 96 cavidades de fundo chato.

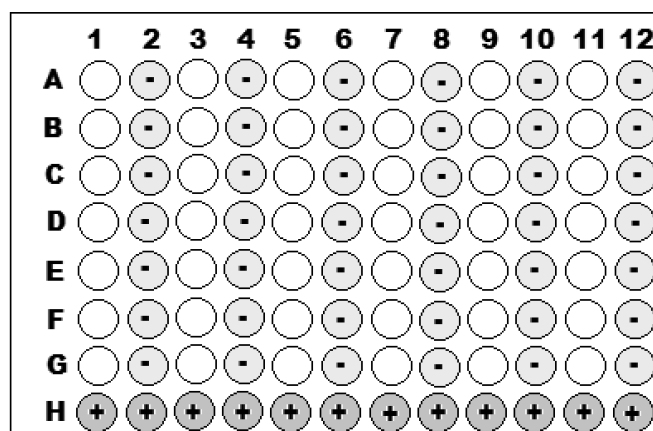
Inicialmente foram distribuídos, em todos os orifícios utilizados, 100 µL de MHB preparados e esterilizados seguindo a metodologia passada pelo fornecedor. Posteriormente foram adicionados na Linha A de todas as colunas 100 µL dos OE previamente preparados, em seguida serão diluídos em série e verticalmente até a linha G, retirando uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a seguinte. Por meio dessas diluições, obteve-se concentrações de antimicrobianos entre 40 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,625 mg.mL<sup>-1</sup> (Figura 4).

Em seguida, nos orifícios de cada coluna ímpar (1, 3, 5, 7, 9, e 11) foi disseminado cerca de 10 µL do inóculo correspondente à cepa ensaiada (Figura 4).

Para controle de qualidade dos lotes, não se adicionou bactérias nas colunas pares (2, 4, 6, 8, 10, e 12) para controle negativo de esterilidade onde, se ocorresse crescimento bacteriano a batelada seria desconsiderada, e nos poços da linha H não foi adicionado OE para controle positivo de viabilidade das bactérias (Figura 4).

As placas de microtitulação foram cuidadosamente agitadas e posteriormente incubadas em duplicata numa estufa BOD (marca Tecnal modelo TE-371) em ar ambiente à 35 °C por um tempo de 24 horas. A leitura da determinação da CIM foi efetuada pelo método visual, considerando como CIM a menor concentração do

antimicrobiano capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento dos micro-organismos utilizados.



**Figura 4 - Organização dos poços na placa de microtitulação de 96 cavidades para o teste CIM. - Poços com controle negativo (MHB + OE); + Poços com controle positivo (MHB + MO).**

### 3.3.3 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada a partir do método de sequestro dos radicais DPPH e pelo método redutor dos íons de ferro, FRAP.

#### *Método DPPH*

Essa análise verifica o consumo do radical livre DPPH pelas amostras de antioxidante pela medida da variação da absorbância de soluções com diferentes concentrações, em que as leituras foram feitas em espectrofotômetro UV/VIS (modelo T80+® da PG Instruments) no comprimento de onda 517 nm.

Para a curva de calibração preparou-se uma solução-mestre de 100 µM e a partir desta realizou-se diluições para preparar soluções com concentrações de 80, 60, 40 e 10 µM. A curva analítica foi construída a partir dos valores da absorbância a 517 nm de todas as soluções, medidas em cubetas de vidro com caminho ótico de 1 cm e tendo como branco o metanol. As medidas de absorbância foram realizadas em duplicata em intervalos de 1 minuto entre cada leitura. A equação da curva de calibração obtida foi  $y = 0,01x + 0,0136$ , onde x corresponde à concentração de radicais DPPH presentes em

solução e  $y$  a absorbância medida a 517 nm. O coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) foi de 0,9995. Para controle positivo utilizou-se o padrão Trolox®.

Os óleos essenciais foram preparados de acordo com o item 3.3.2. As medidas das absorbâncias das soluções-teste (0,6 mL da solução de OE e 5,4 mL da solução de DPPH com concentração de 100  $\mu$ M) foram realizadas 30 minutos após a mistura. Como branco utilizou-se metanol e como controle negativo preparou-se uma solução de 5,4 mL de DPPH (100  $\mu$ M) e 0,6 mL de metanol. O experimento foi realizado em triplicata.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada pela Equação 1.

$$\%AA = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde %AA é a porcentagem de atividade antioxidante,  $A_{\text{controle}}$  a absorbância do controle negativo e  $A_{\text{amostra}}$  a absorbância da solução-teste.

Com base na curva de calibração e dos valores obtidos para as soluções-teste, determinou-se o percentual de DPPH residual (%DPPH<sub>r</sub>) pela Equação 2.

$$\%DPPH_r = \frac{[DPPH]_f}{[DPPH]_i} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde %DPPH<sub>r</sub> é a porcentagem residual dos radicais DPPH,  $[DPPH]_f$  é a concentração dos radicais DPPH nas soluções-teste e  $[DPPH]_i$  a concentração dos radicais DPPH do controle negativo.

Determinou-se graficamente a IC<sub>50</sub> (concentração de 50% de inibição), que é a quantidade de antioxidante necessária para inibir 50% da concentração inicial de DPPH, plotando o efeito redutor na ordenada e as concentrações das soluções-teste na abcissa.

Para uma melhor interpretação da atividade antioxidante, usou-se do Índice de Atividade Antioxidante (AAI), que é calculado de acordo com a Equação 3.

$$AAI = \frac{DPPH_f}{IC_{50}} \quad \text{Equação 3}$$

Onde AAI é o Índice de Atividade Antioxidante,  $DPPH_f$  a concentração final de DPPH e  $IC_{50}$  a concentração de óleo essencial com capacidade de inibição de 50% do radical DPPH.

De acordo com Scherer e Godoy (2009), considera-se ação antioxidante fraca quando o  $AAI < 0,5$ , moderada entre 0,5 e 1,0, forte entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando for superior a 2.

#### *Método FRAP*

A análise do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi realizada pela metodologia descrita por Rufino *et al.* (2006). A solução FRAP foi obtida pela mistura de 25,0 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), 2,5 mL de uma solução 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM que foi utilizado imediatamente após a preparação.

A verificação do poder antioxidante dos óleos essenciais pelo método FRAP ocorreu pela mistura, em tubos de ensaio, de 90  $\mu$ L da solução de OE, 270  $\mu$ L de água destilada e 2,7 mL da solução FRAP. A solução foi homogeneizada em um agitador de tubos e mantida em banho maria à 37 °C por 30 minutos. Após esse período, realizou-se a leitura espectrofotométrica com um espectrofotômetro UV/VIS (modelo GENESYS™ 10 da Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda 595 nm utilizando-se do reagente FRAP como branco. Os óleos essenciais foram preparados de acordo com o item 3.3.2. O experimento foi realizado em triplicata.

Como padrão utilizou-se soluções de sulfato ferroso nas concentrações de 2, 1,5, 1, 0,5 e 0,25 mM que está representada na Figura 5. Os ensaios foram realizados em duplicata. A equação obtida foi  $y = 0,6079x - 0,1275$  com linearidade ( $R^2$ ) de 0,9990. Os resultados obtidos foram expressos em FRAP equivalente ao sulfato ferroso (mM).



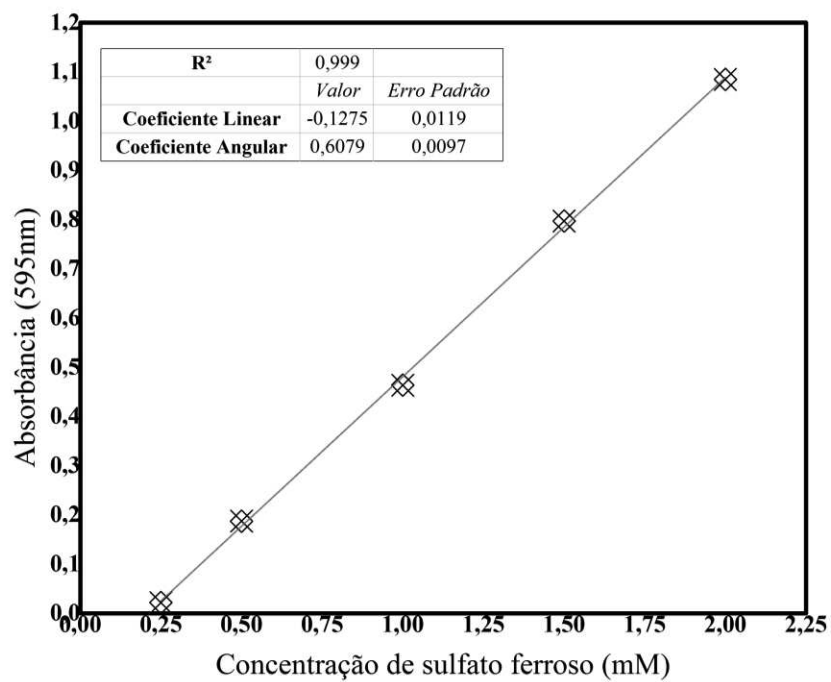


Figura 5 - Curva-padrão de sulfato ferroso.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO

A extração e análise de composição dos óleos essenciais foi realizada pela empresa LASZLO AROMATERAPIA LTDA e nos foi fornecido os laudos de análise química (ANEXOS I-IV) realizados pelo departamento de química da Universidade Federal de Minas Gerais. Os certificados foram analisados e os compostos majoritários reunidos nas tabelas 1-4.

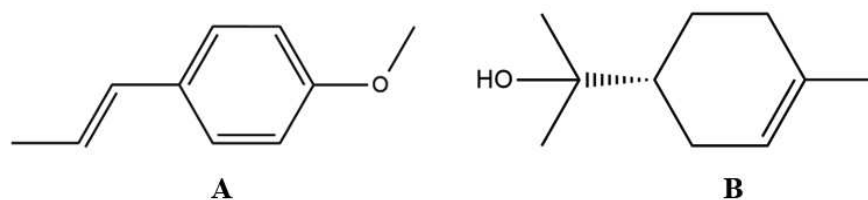
O óleo essencial de Anis Estrelado (*I. verum*) foi extraído das sementes da planta por arraste à vapor. A análise da composição foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução, com coluna capilar HP1 (25m x 0,25 mm), à temperatura inicial de 40 °C e final de 150 °C com variação de 3°C por minuto. A injeção foi realizada à 250 °C, com volume de injeção de 1 µL (com concentração de 0,5% diluído em hexano), A amostra foi detectada por um detector FID à 250 °C (ANEXO I). A composição do óleo está representada na Tabela 1.

**Tabela 1 - Compostos majoritários presentes no óleo essencial das sementes de Anis estrelado.**

<b>Composto</b>	<b>Teor (%)</b>
Trans-anetol	84,1
$\alpha$ -Terpineol	3,6
Limoneno	2,5
Cis-anetol	1,7
Estragol	1,3
<i>Outros</i>	6,8

**Fonte: Laudo técnico**

Os compostos majoritários são o Trans-anetol (Figura 6A) e o  $\alpha$ -Terpineol (Figura 6B). São monoterpenos oxigenados que representam cerca de 90% da composição do óleo essencial, sendo semelhante ao obtido por Cai *et al.* (2013).



**Figura 6 - Estrutura química dos compostos majoritários do anis estrelado.**  
**Fonte: Adaptado de Cai *et al.* (2013)**

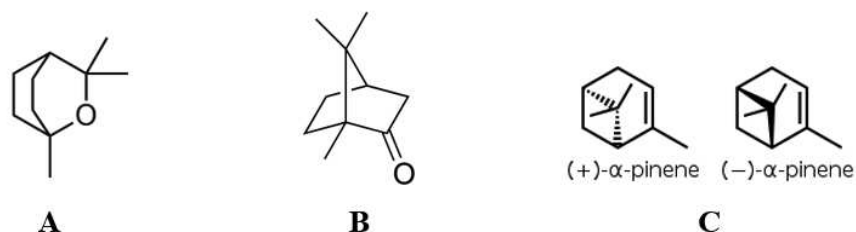
O óleo essencial de alecrim (*R. officinalis L.*) foi obtido por destilação por arraste a vapor da parte aérea da planta, originária da Espanha. A análise do óleo foi feita por cromatografia gasosa de alta resolução com uma coluna capilar DB-Wax (30m x 0,25mm) inicialmente à 40 °C e com final de 150 °C com variação de 3 °C por minuto, a injeção foi de 1 µL de amostra com concentração de 0,5% em hexano à 250 °C (ANEXO II). A detecção foi feita por FID à 250 °C. Os compostos majoritários estão reunidos na Tabela 2.

**Tabela 2 - Compostos majoritários do óleo essencial de alecrim.**

Composto	Teor (%)
1,8-Cineol	32,2
Cânfora	15,2
$\alpha$ -pineno	14,2
canfeno	8,2
$\beta$ -pineno	7,0
limoneno	5,6
Outros	17,6

**Fonte: Laudo técnico**

Os principais compostos são o 1,8-cineol (Figura 7A), cânfora (Figura 7B) e  $\alpha$ -pineno (Figura 7C). Concentração característica aos óleos essenciais obtidos por plantas colhidas na Espanha (PORTE; GODOY, 2001), local de origem das amostras utilizadas neste estudo.



**Figura 7 - Estrutura química dos compostos majoritários do alecrim.**  
**Fonte: Adaptado de Bozin *et al.* (2007)**

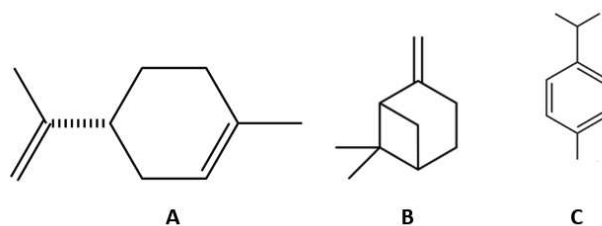
A composição do óleo essencial de limão tahiti (*C. latifolia*) foi obtido por prensagem à frio das cascas dos frutos. A análise da composição foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução, com coluna capilar HP5 (30m x 0,25 mm), à temperatura inicial de 50 °C e final de 170 °C com variação de 3 °C por minuto. A injeção foi realizada à 200 °C, com volume de injeção de 1 µL (com concentração de 0,2% em clorofórmio). A amostra foi detectada por um detector FID à 200 °C (ANEXO III). A composição do óleo está representada na Tabela 3.

**Tabela 3 - Compostos majoritários do óleo essencial de limão tahiti.**

Composto	Teor (%)
Limoneno	51,9
β-pineno	18,0
cimeno	8,2
α-pineno	2,8
Bergamoteno	2,4
<i>Outros</i>	16,7

**Fonte: Laudo técnico**

Os principais compostos são o Limoneno (Figura 8A), β-pineno (Figura 8B) e α-cimeno (Figura 8C).



**Figura 8 - Estrutura química dos compostos majoritários do limão tahiti.**  
**Fonte: Adaptado de Djenane (2015)**

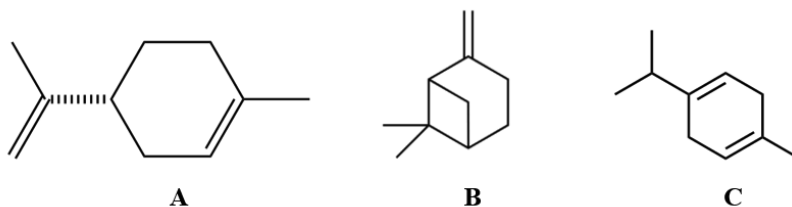
O óleo essencial de limão siciliano (*C. limon*) foi obtido por destilação por arraste a vapor das folhas. A análise do óleo foi realizada por cromatografia gasosa de alta resolução com uma coluna capilar HP1 (25m x 0,25mm) inicialmente à 40 °C e com final de 150 °C com variação de 3 °C por minuto, a injeção foi de 1 µL de amostra com concentração de 0,5% em hexano à 250 °C (ANEXO IV). A detecção foi feita por FID à 250 °C. Os compostos majoritários estão reunidos na Tabela 4.

**Tabela 4 - Compostos majoritários do óleo essencial de limão siciliano.**

Composto	Teor (%)
Limoneno	66,9
β-pineno	11,6
γ-terpineno	7,5
cimeno	2,6
α-pineno	1,7
Outros	16,7

Fonte: Laudo técnico

Os principais compostos são o Limoneno (Figura 9A), β-pineno (Figura 9B) e α-γ-terpineno (Figura 9C)



**Figura 9 - Estrutura química dos compostos majoritários do limão siciliano.**

Fonte: Adaptado de Djenane (2015)

A composição majoritária de limoneno e α-pineno é característica das espécies *Citrus* com mudanças de compostos minoritários dependendo do biótipo, espécie e local de produção/colheita. Em um estudo que avaliou a composição de limões de diferentes nacionalidades Nasser Al-Jabri e Hossain (2014) e identificaram o limoneno como composto majoritário. Em outros estudos, a composição encontrada é praticamente idêntica aos encontrados neste estudo (DJENANE, 2015).

## 4.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

No estudo da atividade antibacteriana dos óleos essenciais comerciais selecionados, pela utilização da técnica de microdiluição em placas de 96 cavidades e pelo uso de controles positivos e negativos, os óleos não apresentaram efeito contra as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhi* e *B. cereus* em concentração igual ou inferior a 20 mg.mL<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em duplicata e, por análise dos controles positivos, não houve contaminação alguma nas bateladas.

Diversas pesquisas demonstram a atividade antimicrobiana do óleo essencial do anis estrelado (*I. verum*). De *et. al.* (2002) testaram extratos etanólicos e etéricos de anis estrelado contra diversos organismos pelo método de difusão em ágar, entre eles bactérias e fungos, a CIM para *E. coli*, *B. cereus*, e *S. aureus* foram, respectivamente, 10, 10 e 20 µg.mL<sup>-1</sup>. Porém, os resultados entre os extratos foram bastante divergentes, pois o extrato etérico não apresentou atividade antimicrobiana. Yang *et. al.* (2010) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos etanólicos e realizados por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico contra cepas de *A. baumannii*, *P. aureginosa*, e *S. aureus* (resistente à meticilina), com CIM de, respectivamente, 5,57±1,80, 7,83±1,34, e 2,42±0,13 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato etanólico e 0,11±0,08, >1 e >1 mg.mL<sup>-1</sup> para o extrato de CO<sub>2</sub> supercrítico. Iauk *et al.* (2003) testaram a eficácia do extrato metanólico de *Illicium verum* contra diversas cepas de bactérias anaeróbicas, e constataram que o extrato não teve boa atividade antibacteriana, exceto contra cepas de *E. corrodens* onde apresentou uma boa atividade com CIM de 256 ppm.

A atividade do óleo essencial de alecrim também tem sido documentada por muitos pesquisadores. Em um trabalho realizado por Bozin *et al.* (2007) no qual se avaliou óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), obtido por hidrodestilação, contra 13 bactérias, o óleo apresentou boa atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *S. enteritidis*, e *Shigela sonnei*, com boa suscetibilidade para a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Genena *et al.* (2008) onde avaliaram a atividade antibacteriana, pelo método de microdiluição com placas de 96 cavidades, de extratos de folhas de alecrim obtidos por CO<sub>2</sub> supercrítico a diferentes faixas de tempo. De acordo com os autores, os resultados indicaram melhor performance do óleo essencial contra bactérias Gram-positivas, especificamente *S.*

*aureus* e *P. aurescens*, e diferentes atividades antibacterianas do óleo essencial quando se variou o tempo de extração.

Jarrar, Abu-Hijleh e Adwan (2010) testaram o extrato etanólico das folhas de alecrim contra cepas de *S. aureus* padrão e outras resistentes à meticilina pelo método de difusão em placas de petri. A CIM obtida para a cepa padrão foi de 0,39 mg.mL<sup>-1</sup> e entre 0,78 e 3,13 mg.mL<sup>-1</sup> para as cepas resistentes à meticilina. Esses resultados reforçam que o alecrim contém muitas substâncias biologicamente ativas que podem ser usadas como antibacterianos.

Segundo Porte e Godoy (2001), a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim é principalmente atribuída ao efeito somatório de diversas substâncias, sendo os compostos hidroxilados, carbonilados e epóxidos os principais responsáveis. Também se supõe que a baixa atividade antimicrobiana se deve pela presença majoritário de hidrocarbonetos monoterpênicos sem núcleos aromáticos e grupos polares funcionais, como o  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -mirceno.

Os óleos essenciais de limão tahiti e limão siciliano que são majoritariamente compostos por limoneno e 1,8 cineol tem sido alvo de recentes estudos de atividade antimicrobiana. Prabuseenivasan, Jayakumar; Ignacimuthu (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar de diversos óleos essenciais comerciais contra diversas cepas bacterianas, entre elas o *S. aureus*, *E. coli*, e *P. aurescens*. O óleo essencial de limão exibiu forte atividade contra as cepas selecionadas e tiveram um efeito igual para ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Nasser Al-Jabri e Hossain (2014) testaram a atividade antibacteriana do OE de limão obtido por hidrodestilação dos frutos obtidos na Turquia e Índia pelo método de difusão em disco contra cepas bacterianas patogênicas, e constataram que há diferença entre os resultados obtidos e nem sempre o óleo essencial de limão possui atividade antimicrobiana *in vitro*. Vuuren; Viljoen (2007) estudaram as interações entre o limoneno e o 1,8-cineol, os autores concluíram que apesar das baixas concentrações inibitórias mínimas, a combinação entre os diferentes isômeros de limoneno e 1,8-cineol indicou principalmente um efeito antagônico na atividade antimicrobiana.

Em um estudo realizado por Djenane (2015) no qual foi avaliado o efeito antibacteriano por técnicas de microdiluição e difusão em ágar de óleos essenciais, extraídos por hidrodestilação à vapor, da casca de diferentes frutas cítricas (limão, bergamota e laranja). Seus resultados indicam que mesmo o limoneno ser o composto majoritário, este apresenta pouca ou nenhuma atividade antibacteriana, supõe-se que os

compostos minoritários como o citral e linalool são responsáveis pela atividade antimicrobiana.

De acordo com diferentes autores, a atividade antimicrobiana de óleos essenciais poderia ser atribuída pela presença de compostos minoritários que podem estar influenciando no efeito sinérgico e poderiam causar efeito antimicrobiano maiores que os esperados pelos compostos majoritários. As propriedades antibacterianas desses compostos está parcialmente relacionada à lipofilicidade levando à acumulação nas paredes bacterianas, desta maneira interferindo na operação e permeabilidade das membranas celulares (BURT, 2004; DJENANE, 2015).

Deve-se notar que há uma variação considerável entre os efeitos antimicrobianos de diferentes espécies de plantas. Essa discrepância pode ser devido à origem botânica das plantas, seu genótipo, quimiotipo, a procedência da planta, região e/ou período de cultivo, a época de colheita, a maturidade da planta, metodologia de preparo de matéria prima, à técnica de extração, parte da planta extraída, a metodologia de avaliação antimicrobiana, condições de cultivo de micro-organismo, concentração testada, agentes diluentes do óleo, etc. Esses fatores são conhecidos por influenciar a atividade antimicrobiana e podem explicar os resultados conflitantes de diferentes estudos (IAUK *et al.*, 2003; BURT, 2004; RIBEIRO, 2011).

### 4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

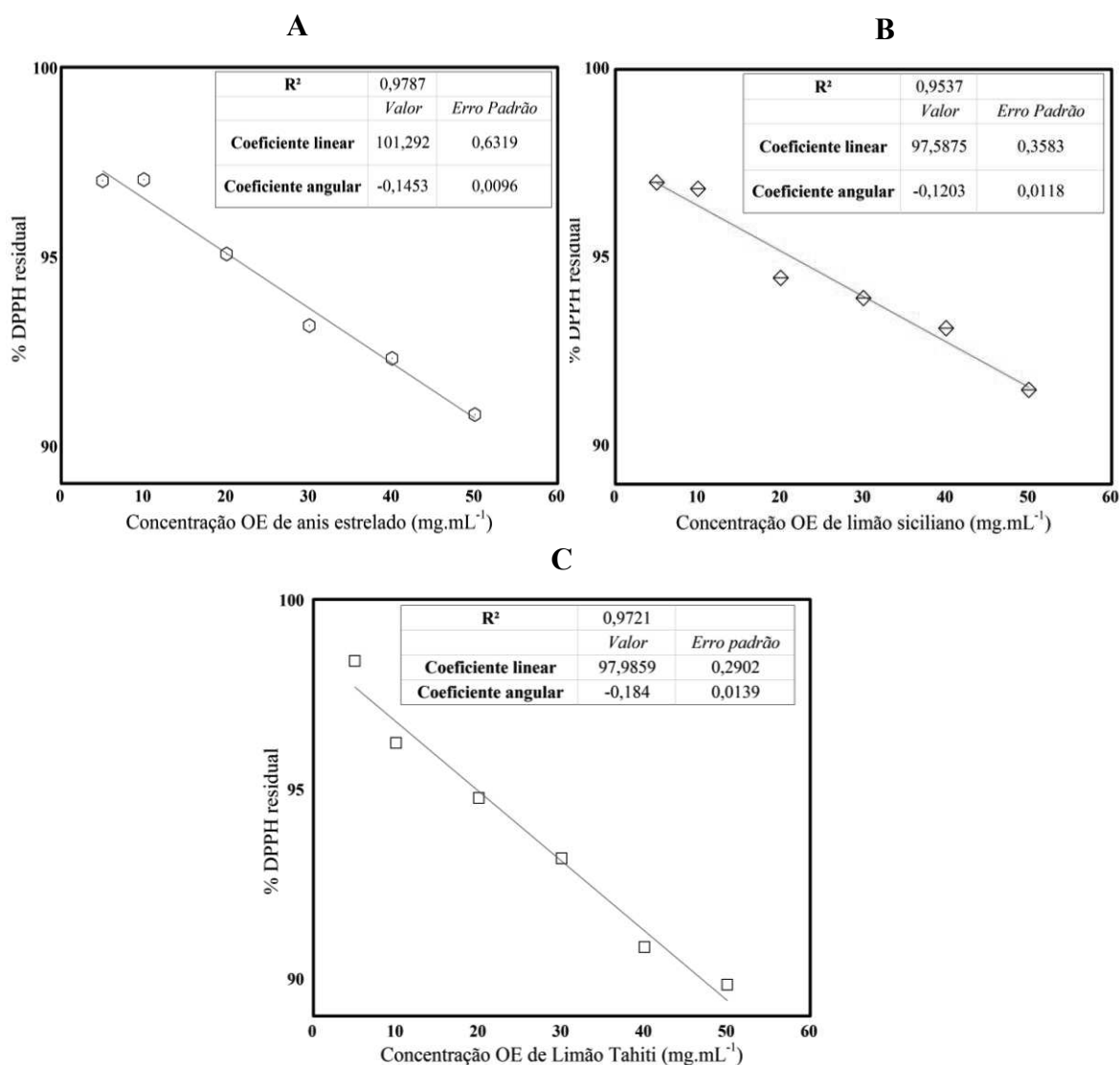
A atividade antioxidante foi observada pelo método de sequestro do radical DPPH e também pela capacidade de redução do ferro (FRAP).

O método de sequestro do radical DPPH é baseado na transferência de elétrons de uma substância antioxidante para um radical livre, o DPPH<sup>+</sup>, que ao ser reduzido perde sua coloração púrpura, sendo assim, avalia-se apenas o poder redutor da substância-teste, que, ao doar um elétron se oxida e por este motivo não se detecta substâncias oxidantes (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Esta metodologia foi usada para avaliar quantitativamente a atividade antioxidante dos óleos essenciais de alecrim, anis estrelado, limão siciliano, limão tahiti. Os resultados de absorvância e a análise dos mesmos estão reunidos no apêndice A, respectivamente.



A variação da concentração residual de DPPH em função da variação da concentração de óleo essencial está representada na Figura 10 (A-C). O alecrim não apresentou atividade antioxidante.

A partir das equações lineares obtidas (APÊNDICE A), determinou-se a concentração inibitória ( $IC_{50}$ ), também denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), que é a concentração necessária para inibir ou decrescer 50% da concentração inicial de DPPH e o índice de atividade antioxidante (AAI) para cada um dos óleos essenciais, estão na tabela 5.

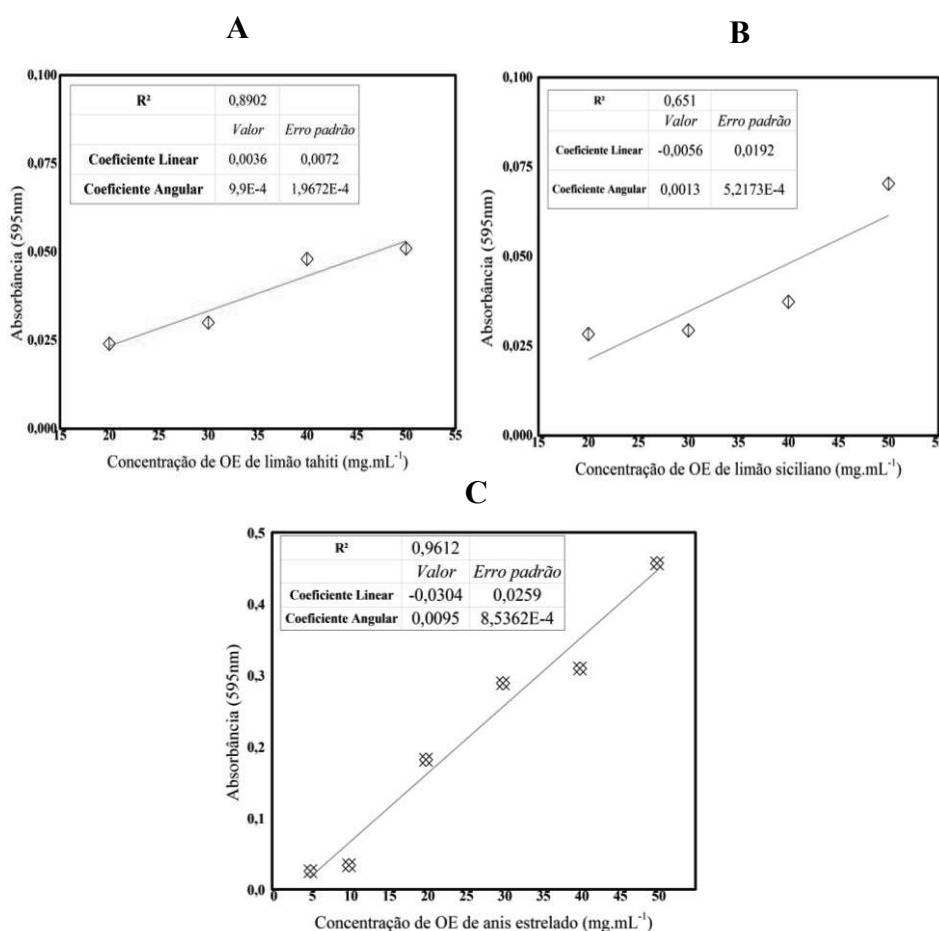


**Figura 10 – Porcentagem de DPPH residual em função da variação da concentração de óleo essencial. (A) OE de anis estrelado. (B) OE de limão siciliano. (C) OE de limão tahiti.**

**Tabela 5 - Resultados da análise de atividade antioxidante pelo método DPPH. <sup>1</sup>Valores em mg.mL<sup>-1</sup>. <sup>2</sup>Índice de atividade antioxidante**

Óleo essencial	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup>	AAI <sup>2</sup>	Equação	R <sup>2</sup>
Limão Tahiti	264.160	0,18	$x = (y-97,9859)/-0,184$	0.9721
Anis estrelado	330.302	0,15	$x = (y-101,292)/-0,1453$	0.9787
Limão Siciliano	395.451	0,13	$x = (y-97,5875)/-0,1203$	0.9537

O comportamento do poder antioxidante de redução do íon férrico (FRAP) observado nas diferentes concentrações de OE testadas (APÊNDICE B) estão representados na Figura 11. Os resultados estão reunidos na tabela 6. Neste método, monitora-se a redução em 595 nm do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe<sup>3+</sup>-TPZ) em complexo ferroso (Fe<sup>2+</sup>-TPZ) de coloração azulada na presença de um antioxidante em condições ácidas, o que pode manifestar a capacidade de compostos antioxidantes em reduzir o íon ferro de sistemas *in vivo* (BRITO, 2014).



**Figura 11 - Comportamento da absorbância de FRAP em função da variação da concentração de óleo essencial. (A) OE de limão tahiti. (B) OE de limão siciliano. (C) OE de anis estrelado**

**Tabela 6 – Resultados do teste FRAP para as diferentes concentrações de óleos essenciais.**  
<sup>1</sup>Valores em mM equivalente ao sulfato ferroso.

Óleo Essencial	Concentração de OE (mg.mL <sup>-1</sup> )					
	50	40	30	20	10	5
Anis Estrelado	0.9609 <sup>1</sup>	0.7186 <sup>1</sup>	0.6846 <sup>1</sup>	0.5086 <sup>1</sup>	0.2651 <sup>1</sup>	0.2514 <sup>1</sup>
Limão Tahiti	0.2936 <sup>1</sup>	0.2887 <sup>1</sup>	0.2591 <sup>1</sup>	0.2492 <sup>1</sup>	-	-
Limão Siciliano	0.3254 <sup>1</sup>	0.2711 <sup>1</sup>	0.258 <sup>1</sup>	0.2563 <sup>1</sup>	-	-

O OE de alecrim não apresentou atividade antioxidante por ambos os métodos. A análise da composição do alecrim não apresenta componentes com atividade antioxidante previsível, como compostos fenólicos e derivados do ciclohexano, como o terpeno. Amorati, Foti e Valgimigli (2013) reuniram os resultados de diferentes testes de atividade antioxidante do OE de alecrim encontrados na literatura, estes mostram desde a ausência de atividade até atividades maiores que antioxidantes sintéticos, como o BHT. Os resultados indicam que o óleo de alecrim não é antioxidante, porém o efeito antioxidante depende do método de extração, o extrato hidroalcoólico, i.e., tem um poderoso efeito antioxidante devido aos compostos fenólicos (i.e., carnosol, ácidos carnosínico e ácido rosmarínico) que são geralmente perdidos por volatilização durante a extração aquosa do OE de alecrim.

Hernández-Hernández *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de alecrim obtidos por maceração com etanol e refluxo com clorofórmio e perceberam que, apesar dos extratos etanólicos apresentarem concentrações de fenólicos totais significativamente maior, ambos apresentaram boa atividade antioxidante, salientando que a atividade antioxidante não depende apenas da concentração de fenólicos totais, mas também da polaridade, hidrofobicidade e estrutura molecular do composto em estudo. Resultado semelhante foi encontrado por Erkan, Ayranci e Ayranci, (2008).

Bozin *et al.* (2007) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de alecrim obtido por hidrodestilação pela capacidade de sequestrar radicais e inibição da peroxidação lipídica, concluindo que o OE de alecrim apresentou melhores resultados no sequestro de radicais que na inibição da peroxidação lipídica. Sugerindo que no primeiro estágio de avaliar o potencial antioxidante de compostos *in vitro*, e devido à complexidade da composição de OE, dois ou mais testes devem ser realizados, pois cada teste avalia uma propriedade da atividade antioxidante, como a habilidade de

sequestrar radicais, inibição da peroxidação lipídica, a quelagem de íons de metais de transição, etc.

As diferentes espécies de limão apresentaram resultados distintos. O limão tahiti apresentou maior atividade que o limão siciliano pelo método DPPH, com IC<sub>50</sub> de, respectivamente, 278,55 e 386,43 mg.mL<sup>-1</sup> com AAI de 0,18 e 0,13, nesta ordem. A baixa atividade antioxidante, comprovada pelo AAI, pode ser explicada pela presença significativa do pineno, altamente oxidante, e baixa concentração de compostos com atividade oxidante comprovada, como o  $\gamma$ -terpineno, cimeno e  $\beta$ -bisaboleno (GUO-XIANG; ZAI-QUN, 2009; SALEH *et al.*, 2010; AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013; KAZEMI; ROSTAMI, 2015). Em contrapartida o óleo essencial limão siciliano apresentou uma maior atividade redutora do íon férrico pelo método FRAP.

A maior atividade antioxidante pelo método DPPH do limão tahiti quando comparada com o limão siciliano pode ser explicada pelas maiores quantidades de cimeno e a presença de bergamoteno e  $\beta$ -bisaboleno que têm atividade antioxidante comprovada e podem estar atuando em sinergismo com o limoneno.

O limoneno é um monoterpeno presente em frutas cítricas e é usado como agente aromatizante em alimentos como refrigerantes, sucos de fruta, pudins, sorvetes, etc. Este composto tem atividade no sequestro do radical DPPH e inibição da lipoperoxidação encontradas na literatura (ROBERTO *et al.*, 2010). Junior *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante do padrão de limoneno pelo método de sequestro do radical DPPH e inibição da lipoperoxidação e observa-se uma fraca atividade sequestrante de radicais DPPH e baixa inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico).

Guo-Xiang; Zai-Qun (2009) avaliaram a atividade antioxidante do  $\gamma$ -terpineno pelo método de sequestro dos radicais DPPH e ABTS, e perceberam uma alta atividade antioxidante, superando o antioxidante sintético Trolox®. O cimeno teve atividade antioxidante relatada por Saleh *et al.* (2010).

Em um estudo que avaliou o efeito inibitório do  $\alpha$ -pineno no crescimento da raiz de diferentes plantas, concluiu que esse composto aumentou a peroxidação lipídica (SINGH *et al.*, 2006). Aydin, Türkez; Geyikoğlu (2013) também relataram alto estresse oxidativo total do  $\alpha$ -pineno.

O anis estrelado, composto majoritariamente por trans-anetol apresentou uma baixa atividade sequestradora de radicais DPPH, com IC<sub>50</sub> de 330 mg.mL<sup>-1</sup> e AAI de 0,15, considerado como fraca atividade antioxidante. Resultados estes que estão em

discrepância com outros encontrados na literatura. A análise pelo método FRAP indicou uma alta capacidade redutora do íon férrico.

A atividade antioxidante de extratos com solventes orgânicos e com fluidos supercríticos do óleo essencial de *I. verum* foi avaliada e observou-se que frações de extratos de éter etílico e acetato etílico apresentaram boas atividades antioxidantes com IC<sub>50</sub> de 57,43 e 38,60 ppm, respectivamente. Extratos com hexano e EFS apresentaram pouca atividade antioxidante (CHENG-HONG YANG, 2012). Extratos metanólicos e etanólicos também foram avaliados e constatou-se um IC<sub>50</sub> de 88,9 e 93,2 mg.mL<sup>-1</sup>, nesta ordem. O óleo essencial puro também foi testado e apresentou a menor atividade antioxidante numa concentração de 55,6 mg.mL<sup>-1</sup> (ALY *et al.*, 2014). CAI *et al.*, (2013) avaliaram a atividade antioxidante de óleos essenciais de *I. verum* extraídos por destilação à vapor e por *microwave-assisted extraction* com etanol e observaram que o extrato etanólico apresentou maior atividade antioxidante à mesma concentração. Sendo assim, o óleo essencial de anis estrelado apresenta um grande potencial como antioxidante natural, porém o processo de extração deve ser aprimorado para que maiores rendimentos de extração e qualidade do produto sejam obtidos.

Como observado pelos resultados acima discutidos, a composição dos OE é o fator determinante para a atividade antioxidante, sendo os compostos fenólicos e monoterpenos oxigenados os principais componentes antioxidantes. A ausência destes pode justificar a baixa, e até ausência, atividade antioxidante nos OE discutidos acima. A composição varia muito com o biótipo da planta e principalmente pelos diferentes métodos de extração, que altera, em grande porcentagem a concentração de compostos oxigenados e fenólicos.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que os óleos estudados apresentaram nenhuma ou baixa capacidade sequestrante de radicais, o que pode ser explicado pela ausência de compostos fenólicos e baixa concentração de terpenos oxigenados na composição dos mesmos. O óleo essencial de anis estrelado apresentou boa atividade redutora do íon férrico, o que pode ser explicado pelo *trans*-anetol, um monoterpene oxigenado. No entanto, sugere-se que a atividade antioxidante como inibidor da peroxidação seja avaliada.

A atividade antibacteriana foi estudada e verificou-se que a uma concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup> nenhum dos óleos essenciais apresentou atividade inibitória. Essa condição pode ser explicada por diversos fatores, deste o biótipo da planta até as metodologias de extração e análise. Para uma completa análise de atividade antimicrobiana, estudos de atividade antifúngica devem ser realizados em associação com análises de toxicidade para comprovar a viabilidade como aditivo alimentício desses óleos essenciais.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ALY, S. E.; SABRY, B. A.; SHAHEEN, M. S.; HATHOUT, A. S. Assessment of antimycotoxigenic and antioxidant activity of star anise (*Illicium verum*) *in vitro*. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 1, p. 20–27, 2014.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835–10847, 2013.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 14, DE 28 DE FEVEREIRO DE 2007**, 2007.
- ARAÚJO, A. D. S. **Microbiologia Geral**. Universidade Federal De Campina Grande, Pombal, 2010.
- AYDIN, E.; TÜRKEZ, H.; GEYIKOĞLU, F. Antioxidative, anticancer and genotoxic properties of  $\alpha$ -pinene on N<sub>2</sub>a neuroblastoma cells. **Biologia**, v. 68, n. 5, p. 1004–1009, 1 jan. 2013.
- BAKKALI, F.; AVERBEK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 446–475, 2008.
- BARBOSA, D. B. M. **Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon Winterianus* Jowitt (Citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus***. 2011. Tese (Doutorado em Odontologia), 93f. Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa - PB, 2011.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., *Lamiaceae*) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7879–7885, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRITO, A. V. R. **Determinação da composição química e avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *croton linearifolius* (euphorbiaceae)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga -BA, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 201–206, 2004.

CAI, M.; GUO, X.; LIANG, H.; SUN, P. Microwave-assisted extraction and antioxidant activity of star anise oil from *Illicium verum* Hook.f. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 11, p. 2324–2330, 2013.

CHENG-HONG YANG. Investigation of the antioxidant activity of *Illicium verum* extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 2, p. 314–324, 2012.

CLSI. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; Norma Aprovada— Sexta Edição Resumo**. v. 23 n. 2, 2003,

MORAIS, S. M.; CATUNDA, F. E. A.; DA SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; LEAL CARDOSO, J. H. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Cróton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907–910, 2006.

DE, M.; DE, A. K.; SEN, P.; BANERJEE, A. B. Antimicrobial properties of Star anise (*Illicium verum* Hook f). **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 1, p. 94–95, 2002.

DHANA VADE, M. J.; JAKULTE, C. B.; GHOSH, J. S.; SONAWANE, K. D. Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon L.*) Peel Extract. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 119–122, 2011.

DJENANE, D. Chemical Profile, Antibacterial and Antioxidant Activity of Algerian Citrus Essential Oils and Their Application in *Sardina pilchardus*. **Foods**. p. 208–228, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. DOS; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema B-Caroteno/Ácido Linoléico E Método De Seqüestro De Radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract, blackseed (*Nigella sativa L.*) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, n. 1, p. 76–82, 2008.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2a ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2005.

EVANGELISTA, J. **Alimentos – Um Estudo Abrangente**. 1a ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2007.

GENENA, A. K.; HENSE, H.; SMANIA JUNIOR, A.; SOUZA, S. M. DE. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 463–469, 2008.



GEUS, J. A. M. DE; LIMA, IS. A. DE. ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS : Um comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. **II Encontro de Engenharia e Tecnologia dos Campos Gerais**, n. 1997, p. 1–6, 2005.

GUO-XIANG, L.; ZAI-QUN, L. Unusual antioxidant behavior of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3943–3948, 2009.

HAVELAAR, A. H.; BRUL, S.; DE JONG, A.; DE JONGE, R.; ZWIETERING, M. H.; TER KUILE, B. H. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S79–S94, 2010.

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

IAUK, L.; LO BUE, A. M.; MILAZZO, I.; RAPISARDA, A.; BLANDINO, G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 6, p. 599–604, 2003.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6th. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JÚNIOR, A. B. DA S. **Alecrim**. Disponível em: <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/Alecrim.pdf>>. Acesso em: 16 maio. 2016.

JUNIOR, M. R. M.; SILVA, T. A. A. R. E; FRANCHI, G. C.; NOWILL, A.; PASTORE, G. M.; HYSLOP, S. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 8–12, 2009.

KAZEMI, M.; ROSTAMI, H. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Psammogeton canescens*. **Natural product research**, v. 29, n. 3, p. 277–80, fev. 2015.

LANZA, J. **Surtos alimentares no Brasil – dados atualizados em 2015**. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2015>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

LASZLO. Disponível em: <<http://laszlo.ind.br/>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. DE. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. Dissertação (mestrado em Agroquímica), 151f. Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, 2010.

NASSER AL-JABRI, N.; HOSSAIN, M. A. Comparative chemical composition and antimicrobial activity study of essential oils from two imported lemon fruits samples against pathogenic bacteria. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 247–253, 2014.

PATRO, R. **Alecrim - *Rosmarinus officinalis***. Disponível em: <<http://www.jardineiro.net/plantas/alecrim-rosmarinus-officinalis.html>>. Acesso em: 16 maio. 2016.

PEREIRA, A. DE A.; CARDOSO, M. DAS G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R. DE; GUIMARÃES, L. G. DE L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, 2008.

PINTO, D. M. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. Dissertação (mestrado em Fármaco e Medicamentos), 81f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, 2009.

PORTE, A; GODOY, R. Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, p. 193–210, 2001.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 6, p. 39, 2006.

PRADO, L. S. **Anis Estrelado**. Disponível em: <<https://institutoalmaconsciente.wordpress.com/2013/08/21/anis-estrelado/>>. Acesso em: 16 maio. 2016.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4288, 2013.

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

RIBEIRO, D. S. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos *in vitro* e em matriz alimentícia**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), 98f. Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 2011.

ROBERTO, D.; MICUCCI, P.; SEBASTIAN, T.; GRACIELA, F.; ANESINI, C.

Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulation and cell proliferation. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, n. 1, p. 38–44, 2010.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167–174, 2000.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; MORAIS, S. M. DE; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado técnico**, v. 125, p. 1–4, 2006.

SALEH, M. A; CLARK, S.; WOODARD, B.; DEOLU-SOBOGUN, S. A. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Essential Oils. **Ethnicity and Disease**, v. 20, p. 78–82, 2010.

SANTANA, E. H. W. DE; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 545–554, 2010.

SANTOS, A. C. D. M.; ZIDKO, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; GALES, A. C.; SILVA, R. M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da saúde**. São Paulo: [s.n.].

SANTOS, J. C. **Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre microorganismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*)**. Dissertação (mestrado em Ciência de Alimentos), 83f. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654–658, 2009.

SEBRAE. **O cultivo e o mercado do limão**. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/o-cultivo-e-o-mercado-do-limao>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

SEETARAMAIAH, K.; SMITH, A. A.; MURALI, R.; MANAVALAN, R. Preservatives in Food Products – Review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 2, n. 2, p. 583–599, 2011.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 9, p. 930–940, 2010.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85–100, 2002.

SILVA, F.; FERREIRA, S.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action

evaluated by flow cytometry. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1479–86, out. 2011.

SILVA, N. C. C. S. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada ), 75f. Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2010.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KAUR, S.; ARORA, K.; KOHLI, R. K. alpha-Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots. **Annals of botany**, v. 98, n. 6, p. 1261–9, dez. 2006.

SOUZA, W. DE. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em alimentos). 31f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão - PR, 2013.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. D. O.; SOUZA, E. L. DE; TRAVASSOS, A. E. R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 542–545, 2009.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G.; GRAZIA, M. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

VAZ, A. P. A.; JORGE, M. H. A. **Alecrim**, 2006. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/pantanal/busca-de-publicacoes/-/publicacao/812770/alecrim>>

VUUREN, S. F. V.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. November, p. 206–213, 2007.

YANG, J.-F.; YANG, C.-H.; CHANG, H.-W.; YANG, C.-S.; WANG, S.-M.; HSIEH, M.-C.; CHUANG, L.-Y. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1254–1262, 2010.

## APÊNDICE A

Óleo Essencial	OE	DPPH média	Absorbância média	%AA	% DPPH residual	IC50	AAI*	Equação
	mg/mL	μM						
Limão Tahiti	5	92.074	0.939	1.607	98.369	264.160	0.177	$x = (y-97,9859)/-0,184$
	10	90.050	0.918	3.739	96.206			
	20	88.689	0.905	5.171	94.753			
	30	87.196	0.890	6.744	93.157			
	40	85.005	0.868	9.050	90.817			
Anis Estrelado	50	84.077	0.858	10.028	89.825	330.302	0.146	$x = (y-101,292)/-0,1453$
	5	93.302	0.951	2.959	96.999			
	10	93.335	0.951	2.925	97.033			
	20	91.444	0.932	4.864	95.067			
	30	89.618	0.914	6.735	93.169			
Limão Siciliano	40	88.789	0.906	7.585	92.306	395.451	0.126	$x = (y-97,5875)/-0,1203$
	5	96.5873	0.984	2.959	97.001			
	10	96.4213	0.982	3.123	96.834			
	20	94.065	0.959	5.457	94.467			
	30	93.534	0.953	5.983	93.934			
Alecrim	40	92.738	0.945	6.772	93.135	1280.29	0.040	$x = (y-101,92)/-0,0401$
	50	91.112	0.929	8.383	91.502			
	5	103.424	1.053	-2.102	102.131			
	10	101.432	1.033	-0.162	100.164			
	20	100.934	1.028	0.323	99.672			
	30	101.830	1.037	-0.550	100.557			
	40	100.702	1.025	0.550	99.443			
	50	100.835	1.027	0.420	99.574			

**Tabela 1A - Resultados médios e equações lineares obtidas, a partir destes, obteve-se o IC<sub>50</sub> e índice de atividade antioxidante (AAI).**

## APÊNDICE B

Óleo essencial	∥ mg/mL	Absorbância média	mM FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O EQ
Anis Estrelado	50	0.457	0.961
	40	0.309	0.719
	30	0.289	0.685
	20	0.182	0.509
	10	0.034	0.265
	5	0.025	0.251
Limão tahiti	50	0.051	0.294
	40	0.048	0.289
	30	0.030	0.259
	20	0.024	0.249
	10	-0.010	0.193
	5	-0.014	0.186
Limão Siciliano	50	0.070	0.325
	40	0.037	0.271
	30	0.029	0.258
	20	0.028	0.256
	10	-0.020	0.176
	5	-0.028	0.164
Alecrim	50	-	-
	40	-	-
	30	-	-
	20	-0.062	0.108
	10	-0.089	0.063
	5	-0.069	0.097

**Tabela 2A – Absorbâncias de FRAP obtidas à 595 nm. A partir da média e a equação obtida pelo sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O),  $y = 0,6079x - 0,1275$ , obteve-se a concentração em mM equivalente (EQ) ao sulfato ferroso.**



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

UFMG

## CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

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

### ÓLEO ESSENCIAL DE ANIS ESTRELADO

Nome comercial: Anis Estrelado.

Nomenclatura botânica: *Illicium verum*.

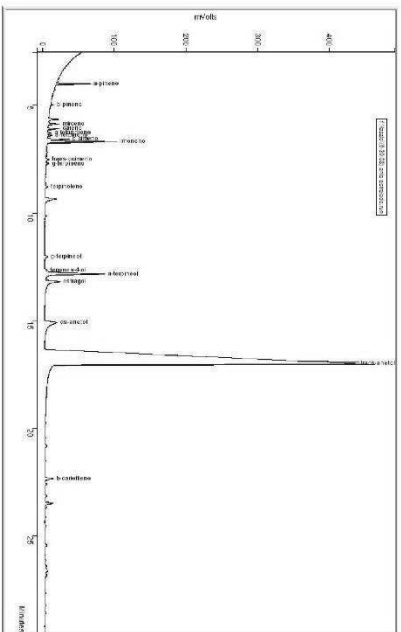
Extração: Destilação por arraste à vapor.

Método de cultivo: Sem controle

Parte da planta: Sementes.

Origem: China.

Comentários:



#### Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	α-pineno	0,9
2	β-pineno	0,1
4	miceno	0,4
5	careno	0,4
6	α-felandreno	0,1
7	α-terpineno	0,2
8	p-cimeno	0,8
9	limoneno	2,5
10	trans-ocimeno	0,1
11	γ-terpineno	0,1
12	terpinoleno	0,1
14	γ-terpineol	0,2
15	terpinen-4-ol	0,1
16	α-terpineol	3,6
17	estragol	1,3
18	cis-anetol	1,7
19	trans-anetol	84,1
20	β-carotilieno	0,4

Obs.: Picos menores que 0,1% foram excluídos

*Vany Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 01/07/2008

**Método de análise:**  
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução  
 Coluna: HP1, 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (1min), 3°C/min, até 150°C.  
 Injetor: 250°C Split: 1/200. Detetador FID: 250°C. Volume de injeção: 1 µl (conc 0,5% em hexano)

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep:31.270-901



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

UFMG

### CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

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

#### ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM DA HORTA QT2

Nome comercial: Alecrim QT2 (quimiotipo cineol), Alecrim da horta, Rosemary.

Nomenclatura botânica: Rosmarinus officinalis L. var. cineoliferum

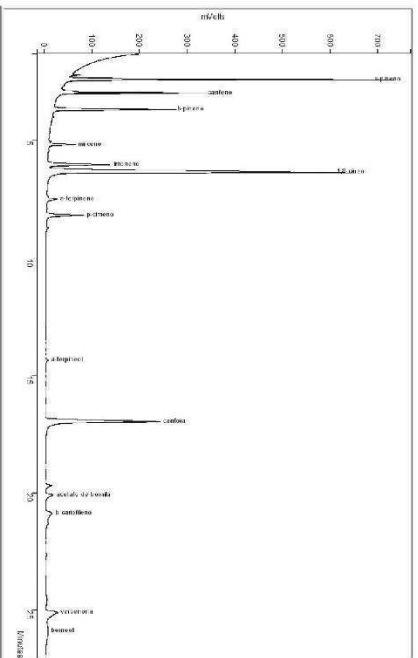
Extração: Destilação por arraste à vapor.

Método de cultivo: Sem agrotóxicos

Parte da planta: Parte aérea.

Origem: Espanha.

Comentários:



Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
2	α-pineno	14,2
3	canteno	8,2
4	β-pineno	7,0
6	mirceno	1,8
9	limoneno	5,6
10	1,8-cineol	32,2
12	α-terpineno	1,1
14	p-cimeno	3,3
17	cãfora	15,2
19	acetato bornila	1,2
20	β-cariofileno	2,3
25	verbenona	2,3
26	borneol	1,9

Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

*F. V. Ferraz*

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 19/06/2008

Método de análise:  
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução  
 Coluna: DB-Wax 30m x 0,25mm (J&W Scientific). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C. Injetor: 250°C. Split: 1/200. Detetor FID: 250°C. Volume de injeção: 1 µl (conc 0,5% em hexano)

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG – Brasil – Cep.: 31.270-901





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

UFMG

### CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Composição Química:

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

#### ÓLEO ESSENCIAL DE LIMA TAHITI PENSADA

Nome comercial: limão tahiti, lima da pérsia, limete

Lote:

Nomenclatura botânica: Citrus aurantifolia

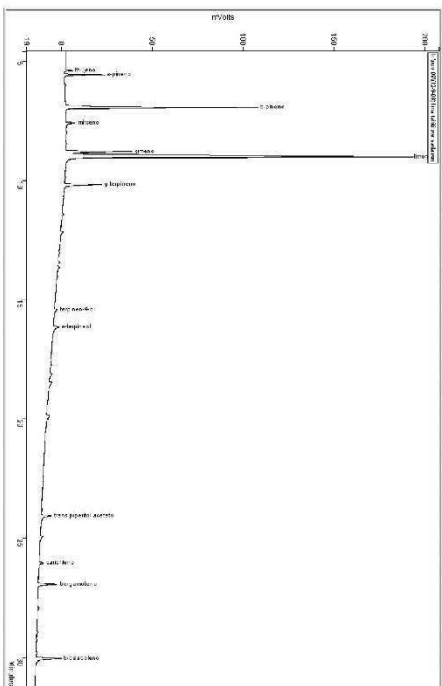
Extração: prensagem a frio

Método de cultivo: convencional

Parte da planta: cascas dos frutos

Origem: Brasil

Pico	Constituinte	ID	%
1	thujeno		0,5
2	α-pineno		2,8
3	β-pineno		18,0
4	miraceno		1,1
5	cimeno		8,2
6	limoneno		51,9
7	γ-terpineno		3,7
8	terpinen-4-ol		0,5
9	α-terpineol		1,1
10	piperital acetato		1,5
11	carotileno		0,6
12	bergamoteno		2,4
13	β-bisaboleno		3,7



Obs: Picos menores que 0,1% foram excluídos

Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 14/12/2009

Método de análise:  
 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução  
 Coluna: HP5 30m x 0,25mm (HP). Tempo: Coluna: 50°C (3min), 3°C/min, até 170°C. Injetor: 200°C  
 Split: 1/200. Detector FID: 200°C. Volume de injeção: 1 µl (conc 0,2% em clorofórmio)

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep:31.270-901



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

UFMG

### CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

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

#### ÓLEO ESSENCIAL DE LIMÃO SICILIANO

Composição Química:

Pico	Constituinte ID	%
1	α-thujeno	0,4
2	α-pineno	1,7
3	carefeno	0,1
4	β-pineno	11,6
5	mirceeno	1,6
6	α-felandreno	0,4
8	p-cimeno	2,6
9	limoneno	66,9
11	γ-terpineno	7,5

**Nome comercial:** Limão Siciliano Maduro.

**Lote:** lmsim 16

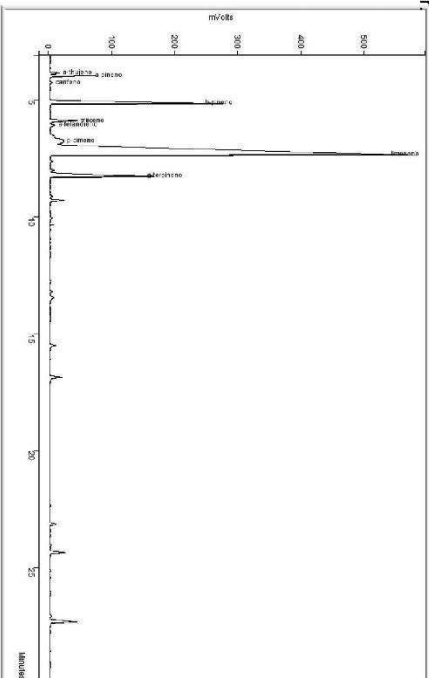
**Nomenclatura botânica:** Citrus medica limmomm.

**Extração:** Destilação por arraste à vapor.

**Método de cultivo:** convencional.

**Parte da planta:** Folhas.

**Origem:** Brasil.



Dra. Vany Ferraz  
 Laboratório de Cromatografia  
 Departamento de Química – UFMG  
 vanyferraz@ufmg.br  
 Belo Horizonte, 06/10/2008

#### Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução  
 Coluna: HP1 25m x 0,25mm (HP). Temperaturas: Coluna: 40°C (3min), 3°C/min, até 150°C.  
 Injetor: 250°C Split: 1/200. Detector FID: 250°C. Volume de injeção: 1 µl (conc 0,5% em hexano)

**Obs:** Picos menores que 0,1% foram excluídos