

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

LAÍSA CAROLINE SCHOSSLER BELUSSO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ASSOCIAÇÕES
COM CONSERVANTES DE ALIMENTOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Toledo

2014

LAÍSA CAROLINE SCHOSSLER BELUSSO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ASSOCIAÇÕES COM
CONSERVANTES DE ALIMENTOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado na 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, como requisito para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof. Dra. Tatiana Shioji Tiuman

Toledo

2014

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

LAÍSA CAROLINE SCHOSSLER BELUSSO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E ASSOCIAÇÕES
COM CONSERVANTES DE ALIMENTOS**

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^ª. Dr^ª. Tatiana Shioji Tiuman
UTFPR – Câmpus Toledo
Orientador

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
UTFPR – Câmpus Toledo
Membro

Prof^ª. M^a. Juliana Bernardi Wenzel
UNIPAR – Câmpus Toledo
Membro

Toledo, Dezembro de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais Cleci e Olair, que tornaram possível a minha existência e me deram todas as condições para continuar minha jornada.

À minha irmã Ana, desde sempre e para sempre comigo.

Às minhas avós, Celeste e Tarsila e meu avô Nadir, que ajudaram na formação do meu caráter.

À minha querida tia e madrinha Sandra, pelo apoio em todos os momentos e pela contribuição na minha formação profissional.

Ao meu namorado Ricardo, que comigo está em todos os momentos, ensinando e aprendendo, me ajudando a superar inúmeras dificuldades e me proporcionando alegria e tranquilidade nos momentos de turbulência. Obrigada!

RESUMO

BELUSSO, Laísa Caroline Schossler. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e associações com conservantes de alimentos. 2014. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Coordenação de Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2014.

A crescente produção de alimentos traz à tona a necessidade de novas tecnologias que melhorem a conservação de alimentos com menores riscos à saúde humana. Assim, este trabalho objetivou avaliar a atividade de óleos essenciais contra micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos, e estudar o efeito sinérgico destes com conservantes químicos. Para isso, foram utilizados quatro micro-organismos comumente veiculados por alimentos: bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*. Foram utilizados óleos essenciais de canela, gengibre, hortelã, melaleuca e tangerina, além dos conservantes químicos metilparabeno e ácido acético. Foram realizados testes com óleos essenciais e conservantes, além de testes de associações, determinando as concentrações inibitórias mínimas por meio do uso de microdiluições sucessivas, verificando a presença ou ausência de sinergismo. O óleo essencial de tangerina não apresentou potencial bactericida, sendo ineficiente para o controle do desenvolvimento microbiano. O óleo essencial de melaleuca apresentou resultados satisfatórios quando isolado (1,04 mg.mL⁻¹ para *E. coli*), contudo, apresentou efeitos negativos quando testado em conjunto com os conservantes químicos. Os melhores resultados foram referentes ao óleo essencial de canela, com as menores concentrações inibitórias (0,351 mg.mL⁻¹ para *Salmonella typhi*) e presença de sinergismo quando associado ao conservante químico metilparabeno, reduzindo significativamente a concentração eficaz deste conservante (0,470 para 0,059 mg.mL⁻¹ para *Salmonella typhi*). Pode-se concluir que a associação entre o óleo essencial de canela e metilparabeno consistem em uma excelente alternativa para a conservação de alimentos.

Palavras-chave: preservação de alimentos, sinergismo, segurança alimentar.

ABSTRACT

BELUSSO, Laísa Caroline Schossler. Antimicrobial activity of essential oils and association with food conservatives. 2014. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Coordenação de Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2014.

Increasing food production brings out the need for new technologies that improve food preservation with less risk to human health. Thus, this study evaluated the activity of essential oils against pathogenic foodborne microorganisms, and the synergistic effect of these with food preservatives. Four microorganisms were used: Gram-positive bacteria: *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria: *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. Essential oils of cinnamon, ginger, peppermint, tea tree and tangerine were used in addition to chemical preservatives methylparaben and acetic acid. Tests of associations with essential oils and preservatives were performed, determining the minimum inhibitory concentration and verifying the presence or absence of synergism. Tangerine essential oil showed no bactericidal potential and non-efficacy for microbial growth control. The tea tree essential oil presented satisfactory results when isolated (1.04 mg.mL^{-1} for *E. coli*) but showed negative effects when tested in combination with chemical preservatives. The best results were related to cinnamon essential oil, with the lowest inhibitory concentrations (0.351 mg.mL^{-1} for *Salmonella typhi*) and presence of synergism when combined with chemical preservative methylparaben, significantly reducing the effective concentration of the preservative (0.470 to 0.059 mg.mL^{-1} for *Salmonella typhi*). It can be conclude that the association between the essential oil of cinnamon and methylparaben consist in an excellent alternative for food preservation.

Key words: food preservation, synergism, food safety.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquemas do ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de canela e conservante metilparabeno frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> e <i>Bacillus cereus</i>	30
FIGURA 2 - Isobolograma obtido por meio da associação entre óleo essencial de canela e metilparabeno contra a bactéria <i>Bacillus cereus</i>	32
FIGURA 3 - Esquemas do ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de melaleuca e conservante metilparabeno frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Salmonella typhi</i>	33
FIGURA 4 - Isobogramas representando a relação entre óleo essencial de melaleuca e metilparabeno para <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Salmonella typhi</i>	34
FIGURA 5 - Figuras esquematizando o ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de canela e conservante ácido acético frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Salmonella typhi</i>	35
FIGURA 6 - Figuras esquematizando o ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de melaleuca e conservante ácido acético frente às bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> e <i>Salmonella typhi</i>	36
FIGURA 7 - Isobolograma representando a relação entre óleo essencial de canela e ácido acético para <i>Bacillus cereus</i>	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de óleos essenciais e conservantes químicos contra bactérias patogênicas veiculadas por alimentos e seus respectivos desvios padrões.....	26
TABELA 2 - Concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais contra bactérias patogênicas veiculadas por alimentos e seus respectivos desvios padrões	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Geral	10
2.2 Específico	10
3 JUSTIFICATIVA	11
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
4.1 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS	12
4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	13
4.2.1 Óleo essencial de canela cassia	14
4.2.2 Óleo essencial de gengibre	15
4.2.3 Óleo essencial de hortelã pimenta	16
4.2.5 Óleo essencial de melaleuca	16
4.2.6 Óleo essencial de tangerina	17
4.3 CONSERVANTES QUÍMICOS ALIMENTÍCIOS	18
4.3.1 Metilparabeno	18
4.3.2 Ácido acético	19
4.4 MICRO-ORGANISMOS	19
4.5 SINERGISMO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL E AGENTES ANTIMICROBIANOS .	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Micro-organismos.....	22
5.2 Óleos essenciais	22
5.3 Conservantes químicos	22
5.4 Preparo das soluções e inóculo	22
5.5 Determinação da concentração inibitória mínima	23
5.6 Determinação da concentração bactericida mínima	24
5.7 Associação do óleo essencial com conservante químico.....	24
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÃO	38
8 REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O crescimento exacerbado da população teve como uma de suas consequências o aumento na demanda de alimentos. Esse crescimento populacional junto ao tecnológico impulsionou pesquisas e desenvolvimento de tecnologias no processamento e melhoramento de alimentos industrializados (FAVERO et al., 2011).

Para a melhora da qualidade de alimentos processados, o controle químico de micro-organismos vem sendo utilizado intensivamente nas últimas décadas, criando inúmeros problemas, tais como: resistência microbiana adquirida e elevação dos custos de produção. O controle alternativo com plantas medicinais está sendo atualmente estudado, em função de não apresentarem risco ambiental, serem geralmente inócuas aos animais e seres humanos, bem como apresentar menor custo (SEIXAS et al., 2011).

Para Medice et al. (2007), produtos naturais apresentam vantagens sobre os produtos sintéticos, sendo menos concentrados e, portanto, potencialmente menos tóxicos do que compostos puros. Além disso, esses produtos podem possuir múltiplos modos de ação, tornando possível um amplo espectro de uso, enquanto retêm uma ação seletiva dentro de cada classe de patógeno. Dentre esses produtos naturais podem-se destacar os óleos essenciais.

A degradação de um alimento é promovida, dentre as possibilidades, pela ação de micro-organismos. Estes seres promovem alterações químicas que tem por consequência o comprometimento da qualidade do alimento. Normalmente, a deterioração ocasiona alterações na aparência, odor, sabor e textura. Essas alterações são consequência da atividade metabólica de micro-organismos, que utilizam os nutrientes do alimento como fonte de energia para o funcionamento do seu metabolismo. Os micro-organismos de caráter patogênico promovem o desenvolvimento de infecções ou intoxicações no indivíduo consumidor do alimento contaminado (BRITO, 2011).

Para que os alimentos possam ser transportados e consumidos em longo prazo, faz-se uso de aditivos alimentares. Estas substâncias são adicionadas intencionalmente aos alimentos sem a intenção de nutrir, mas com a finalidade de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação (FAVERO et al., 2011).

Uma das principais características que se busca em um alimento é que este possua uma longa vida útil. Para uma melhora no tempo de duração viável de um alimento, adiciona-se no processo de beneficiamento, um conservante de natureza química que possui ação antimicrobiana e/ou inibe degradações enzimáticas (JOS; VELD, 1996).

Como consequência do desenvolvimento da população, o consumo de alimentos processados têm substituído parcialmente os alimentos *in natura*, sendo que a tecnologia aplicada na conservação dos alimentos processados acaba levando a questionamentos sobre a segurança destes alimentos que tem adição de conservantes químicos (DOWNS; LOEWNSTEIN; WISDOM; 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais com potencial antimicrobiano já conhecido e verificar possível efeito sinérgico com conservantes alimentares químicos contra micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos.

2.2 Específico:

Determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de óleos essenciais contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Determinar a concentração inibitória mínima de conservantes químicos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Avaliar o efeito sinérgico dos óleos essenciais que apresentarem maior atividade antimicrobiana, com conservantes químicos utilizados comumente em alimentos.

3 JUSTIFICATIVA

Os alimentos processados são alvo de inúmeros estudos para o aumento de suas vidas de prateleira, ou seja, para que permaneçam conservados por mais tempo. Para isso, uma das alternativas é o uso de aditivos alimentícios conhecidos como conservantes. Os conservantes têm como principal característica a capacidade de inibir o crescimento microbiano e degradação enzimática nos alimentos nos quais são adicionados.

Contudo, o uso indiscriminado de conservantes químicos em alimentos pode ter como consequência riscos a população. Apesar de serem considerados seguros em baixas concentrações, já foram detectadas reações adversas sendo que podem resultar na indisponibilidade de vitaminas e causar alterações nos valores nutricionais destes alimentos.

Nos países industrializados, as doenças transmitidas por alimentos são de grave questão de saúde pública. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em estimativa feita em 2011, cerca de 48 milhões de casos foram registrados, 128 mil internações e 3 mil óbitos por doenças causadas por alimentos.

O potencial antimicrobiano de substâncias naturais tais como os óleos essenciais os tornam possíveis de serem adicionados simultaneamente aos conservantes químicos em alimentos, a fim de reduzir a concentração do conservante e aumentar a sua eficiência. A redução da concentração implica em uma menor toxicidade do alimento processado, sem que haja interferência no seu potencial de conservação, diminuindo os riscos à população humana, já que o consumo de alimentos contendo conservantes é extremamente crescente.

É possível ainda, que estes óleos essenciais possam ser utilizados como substitutos para os conservantes em certos tipos de alimentos, tornando-os mais seguros para o consumo.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

O uso de baixas temperaturas como método conservacionista consiste em uma das primeiras técnicas a ser utilizada em alimentos, tendo sua fundamentação na perda de calor dos alimentos, reduzindo a reatividade química e atividade enzimática, assim como a inibição, multiplicação e atividade dos micro-organismos (PINTO; NEVES, 2010). De acordo com Lidon & Silvestre (2008), baixas temperaturas tornam admissíveis a presença de micro-organismos não patogênicos nos alimentos. Dependendo do seu tipo, pode ser consumido normalmente. Contudo, em alguns casos, essa conservação não impede que algumas toxinas específicas causem danos graves ao consumidor.

Altas temperaturas são largamente empregadas como método para conservar alimentos. Temperaturas elevadas levando em conta a carga microbiana contida no alimento terão como consequência a desnaturação de proteínas e inativação de enzimas essenciais para o funcionamento metabólico dos micro-organismos. Há diferenças entre os micro-organismos e seus esporos quanto à resistência ao calor empregado, sendo que o tempo e a temperatura irão variar, dependendo do método de aquecimento empregado (FREITAS; FIGUEREDO, 2000).

Certos fatores são essenciais para o desenvolvimento metabólico microbiano, e dentre eles a alta atividade de água. Com isso, utiliza-se o método de desidratação para a conservação de alimentos, baseando-se na evaporação da água neste contida por um mecanismo de vaporização térmica, reduzindo, conseqüentemente, a atividade de água e atividade enzimática (VASCONCELOS; FILHO, 2010).

Tendo em vista a constante evolução dos processos de conservação, a tecnologia de irradiação dos alimentos surgiu na metade do século XX, onde as radiações gama do Cobalto-60 ou do Césio-137 ou mesmo os elétrons acelerados são capazes de controlar, inibir ou combater micro-organismos patogênicos ou indesejáveis, além disso, as radiações ionizantes induzem a pequenas alterações fisiológicas, fazendo com que ocorra a redução do

metabolismo e os alimentos, principalmente frutas, não completem seu ciclo (ORNELLAS et al., 2006).

Os aditivos alimentares são definidos, conforme a Portaria nº 540 – Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), de 27 de outubro de 1997, como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, porém com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (BRASIL, 1997).

Dentre os aditivos adicionados aos alimentos, estão os conservantes químicos, que tem como principal objetivo reduzir ou até mesmo eliminar a atividade microbiana e enzimática ou ainda impedir reações químicas que ocasionam alterações prejudiciais no alimento, evitando contaminações e conservando o alimento por maior faixa de tempo. O conservante químico ideal tem como características a abrangência na eficácia de eliminação de diversas espécies de micro-organismos, não ser tóxico ao ser humano e animais, não influenciar no sabor e nem no aroma do alimento, não estimular o aparecimento de micro-organismos resistentes e não ser inativado por compostos presentes no alimento. Contudo, não há conhecimento de um conservante que reúna todas essas características, sendo que todos têm alguma falha na sua eficácia (VASCONCELOS; FILHO, 2010; FREITAS; FIGUEREDO, 2000).

4.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Condimentos e especiarias tiveram seu uso na antiguidade, principalmente para fins culinários, sendo então percebidas suas propriedades antifúngicas e bactericidas, onde posteriormente passaram a ser utilizadas no processo de mumificação de seus mortos (SHELEF, 1983).

Óleos essenciais são produtos aromáticos de metabolismo secundário de plantas, normalmente produzidos por células secretoras ou grupos de células, sendo encontrados em diversas partes do vegetal, como folhas e talos. Esses produtos resultantes são comuns entre alguns grupos taxonômicos ou característicos de uma determinada espécie, apresentando vantagens para a manutenção e desenvolvimento das plantas responsáveis pela sua

sintetização. Dentre os produtos, encontram-se substâncias que agem na defesa contra patógenos e herbívoros, auxiliam na ação de polinizadores, permitem a tolerância de temperaturas extremas, deficiência de nutrientes e minerais do solo e ainda estresse hídrico (SEIXAS et al., 2011; PROBST, 2012).

Óleo essencial teve sua definição descrita no século XVI por Paracelso, que afirmava que o componente efetivo de uma droga era a “quinta essência”. Quimicamente, caracterizam-se como sendo misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, alguns altamente voláteis, que são muitas vezes responsáveis por gerar sabores e/ou aromas. Os óleos essenciais são responsáveis por parte das propriedades farmacêuticas apresentadas por plantas medicinais (PROBST, 2012).

Com base nas informações das propriedades dessas substâncias, várias pesquisas em todo o mundo vêm sendo desenvolvidas para um emprego racional de conservantes de origem vegetal na cadeia alimentar (CHAO; YANG, 2000).

Algumas espécies de plantas contêm uma variedade de substâncias de ocorrência natural chamadas “fitoquímicas”. As propriedades dos constituintes com funcionalidades conjuntas de ação antimicrobiana e prevenção de oxidação lipídica tornam os óleos essenciais produtos de extremo potencial para o aumento da vida de prateleira de alimentos processados (PRATT, 1992).

Com isso, vários estudos têm comprovado o efeito de compostos extraídos de óleos essenciais de plantas, que atuam como antimicrobianos naturais. Um número significativo destes constituintes tem se mostrado eficaz (SEIXAS et al., 2011), isso devido a constatada existência de compostos como álcoois, ésteres, aldeídos, terpenos, fenóis, ácidos orgânicos e muitos outros elementos (SAGDIÇ, 2003). Dentre os benefícios do uso dos óleos, pode-se citar o fato de melhorar a aceitação do alimento por se tratar de produtos naturais, além de não apresentarem efeito tóxico, mesmo quando empregadas em concentrações relativamente elevadas (SHELEF, 1983).

4.2.1 Óleo essencial de canela cássia

A canela cássia (*Cinnamomum cassia*, Ness & T. Nees), também conhecida como canela da China, pertencente à família *Lauraceae*, é proveniente de uma pequena árvore,

nativa do sul da China e do Vietnã. Á muito, é utilizada como condimento devido às características de sua casca aromática (RAVIDRAN; BABLU; SHYLAJA, 2004).

O óleo essencial de canela cassia é bastante utilizado como aromatizante, flavorizante e conservante natural de alimentos. Estudos comprovam o potencial antimicrobiano do óleo essencial de canela, como inibidor de crescimento de fungos e bactérias (FICHI et al., 2007).

O óleo essencial é caracterizado por misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente de caráter lipofílico (SIMÕES; SPITZER, 1999). Dentre os componentes do óleo, estão presentes, em diferentes concentrações, hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, cetonas, aldeídos, ésteres, fenóis, ácidos orgânicos fixos, dentre outros. A composição do óleo essencial de canela é variável, sendo consequência do local de crescimento e do órgão da planta utilizado. Contudo, muitos estudos relatam os princípios ativos, ou seja, substâncias de caráter majoritário presentes no óleo como sendo o eugenol, que é o componente majoritário do óleo extraído das folhas e o cinamaldeído, princípio ativo do óleo extraído da casca (LIMA et al., 2005; FICHI et al., 2007).

4.2.2 Óleo essencial de gengibre

O gênero *Zingiber* engloba cerca de 85 espécies de ervas, sendo a maioria distribuída no leste da Ásia e Austrália. A maioria destas ervas são utilizadas como alimento e para o tratamento tradicional de uma variedade de doenças (SABULAL et al., 2006).

A composição do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) e sua atividade biológica tem sido alvo de numerosos estudos. A investigação sobre a sua composição química tem revelado a presença de compostos bioativos, como o gingerol, responsável pela característica antibacteriana, shogaol, flavonoides, sesquiterpenóides, diterpenóides, dentre outros. Várias espécies de *Aspergillus* mostraram alta sensibilidade ao óleo essencial de gengibre. Também há estudos que revelam o potencial de inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885), *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884) e *Salmonella* sp. (JANES; NANNAPANENI; JOHNSON, 1999; SINGH et al., 2008).

4.2.3 Óleo essencial de hortelã pimenta

Hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.) é uma planta de importância medicinal e econômica pertencente à família Lamiaceae, híbrida das espécies *Mentha spicata* L. e *Mentha aquatic*. Sua utilização é datada desde a antiguidade, sendo usada pelos antigos egípcios. Sua aplicação está relacionada a alimentos e chás medicinais. É utilizada no tratamento de doenças de pele, problemas nos sistemas circulatório, digestivo, imunológico e nervoso. Seu uso também está relacionado à formulação de pastas de dente, cremes dentais, enxaguante bucal e flavorizante de produtos farmacêuticos (IŞCAN et al., 2002; SINGH, 2011; DERWICH et al., 2011; MOGHTADER, 2013).

As substâncias constituintes de caráter majoritário do óleo essencial de hortelã pimenta são o mentol, a mentona e o metil acetato, sendo que o potencial antimicrobiano é atribuído à alta concentração de mentol presente na planta. Estudos revelam a atividade antibacteriana deste óleo essencial contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (Frankland & Frankland, 1887), *Enterococcus faecium* (Schleifer & Kilpper-Bälz 1984), *Escherichia coli*. Também apresentou forte atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (van Tieghem, 1867) (IŞCAN et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; JEYAKUMAR; LAWRENCE, PAL, 2011; SINGH, 2011; MOGHTADER, 2013).

4.2.4 Óleo essencial de melaleuca

Espécies pertencentes à família *Myrtaceae*, encontram-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais. O gênero *Melaleuca*, que pertence à subfamília *Leptospermoidae* inclui cerca de 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico, florescendo principalmente em áreas próximas de rios e pântanos (VIEIRA et al., 2004).

O óleo essencial de melaleuca, derivado da planta nativa australiana *Melaleuca alternifolia* L., foi historicamente empregado pelo seu efeito antisséptico e anti-inflamatório. É empregado como ingrediente ativo em muitas formulações utilizadas para a cura de infecções cutâneas. Está disponível em grande quantidade na Austrália, Europa e América do Norte (COX et al., 2000; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Dentre todas as propriedades atribuídas ao óleo essencial de melaleuca, a atividade antimicrobiana é a que mais tem recebido atenção, sendo inúmeras pesquisas realizadas para a análise de quais componentes são responsáveis pelo ataque aos micro-organismos (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

A composição química do óleo foi bem definida através de vários estudos, sendo que consiste de monoterpenos cíclicos. Dentre estes, os compostos sugeridos como maiores inibidores do desenvolvimento microbiano são terpeno-4-ol e α -terpineol (COX et al., 2000; CARSON et al., 2002; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Pesquisas revelam que o óleo essencial de melaleuca apresenta-se como inibidor do crescimento de bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* (Link, 1809), *Aspergillus fumigatus* (Fresenius, 1863) e *Penicillium* sp (COX et al., 2000; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; FITZPATRICK, 2010).

4.2.5 Óleo essencial de tangerina

A tangerina (*Citrus reticulata*, Blanco) é proveniente de uma planta vigorosa de tamanho médio, com folhas médias e densas. O fruto é de tamanho médio, muito consumido mundialmente (DONADIO; STUCHI; CYRILLO, 1998).

O grande interesse em frutas cítricas e produtos derivados está relacionado com a associação entre o seu consumo e a diminuição do risco de câncer no estômago, esôfago, colo retal e acidente vascular cerebral (MATAN; MATAN, 2008).

Johnson et al. (2013), ao analisarem a composição do óleo essencial de tangerina encontraram como componentes majoritários o 3-ciclohexano-1-methanol e α -4-trimetil (33,38 %) em um total de trinta e um constituintes.

4.3 CONSERVANTES QUÍMICOS ALIMENTÍCIOS

4.3.1 Metilparabeno

Ésteres do ácido 4-hidroxibenzóico, os parabenos são conservantes com grande potencial antimicrobiano contra fungos e bactérias, utilizado em larga escala pelas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos. Diferenciam-se apenas no grupo éster, podendo ser metil, etil, propil, butil, isopropil, isobutil ou benzil. Metilparabeno e propilparabeno são os mais utilizados, muitas vezes em conjunto devido ao seu potencial sinérgico quando combinados. Estudos comprovam que o potencial antimicrobiano está proporcionalmente relacionado ao tamanho da cadeia alquílica. Contudo, ésteres com longas cadeias possuem solubilidade limitada em água e tendo em vista que o crescimento microbiano se dá somente na presença de água, os torna pouco eficientes. Quando comparado com os outros parabenos, o metilparabeno possui cadeia relativamente curta, o que o torna mais solúvel em água do que os outros parabenos, sendo, portanto, o mais utilizado (SAAD et al., 2005).

A sua ampla utilização está relacionada com sua baixa reatividade, resistência à hidrólises em aquecimento e resfriamento de água, não volatilidade, baixa tendência de absorção em embalagens, incolor, inodoro, biodegradável e de baixo custo (HANDA et al., 2006).

Freese; Sheu; Galliers (1973) relataram o mecanismo de ação destes agentes na célula microbiana, que agem inibindo a oxidação celular através da inibição de compostos que doam elétrons para o mecanismo transportador de elétrons da célula. A deficiência destes compostos doadores tem como consequência a inibição da entrada de substratos na célula. Os parabenos são conhecidos por desacoplar o transporte de substrato e fosforilação oxidativa do sistema de transporte de elétrons da célula, comprometendo o processo de respiração.

A regulamentação quanto ao uso destes compostos é responsabilidade da ANVISA, que através da RDC nº 5 de 15/1/2007 estabelece o uso destes conservantes em alimentos, sendo a concentração de metilparabeno máxima permitida de 0,03 g.100 mL⁻¹.

4.3.2 Ácido acético

O ácido acético é provavelmente uma das mais antigas substâncias a serem aplicadas em alimentos a fim de conservação, tendo essa funcionalidade descoberta pelos Babilônios, evidenciando que a aplicação de vinagre na comida atrasava a ação das bactérias que a atacavam. Sua funcionalidade na forma de vinagre ocorre não somente como ação preservativa, mas também como sequestrantes, acidulantes e agentes flavorizantes. É considerado um ácido natural que se forma no vinagre mediante a ação de bactérias específicas (BRITO, 2011).

De acordo com Marques et al. (2010) seu principal meio de utilização é na forma de vinagre, que além de apresentar utilidade como amaciante de carnes temperadas e legumes em conservas. O vinagre é uma solução aquosa diluída, que embora contenha outros ácidos orgânicos, tem o teor de acidez expresso em termos de ácido acético, e não deve conter menos que 4 % desse ácido (BRASIL, 1990).

Seus efeitos antimicrobianos são atribuídos a alterações causadas no pH, embora a forma não dissociada do ácido aumente sete vezes o pH entre 5 e 6, seu efeito antimicrobiano apenas duplica (GEORGE; METRIS; STRINGER, 2008). A ação inibitória do ácido acético é conseguida através da neutralização do gradiente eletroquímico da membrana celular, assim como pela desnaturação das proteínas dentro das células (RAY; BHUNIA, 2008).

4.4 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos foram as primeiras formas de vidas na Terra a apresentar características básicas de sistema vivo. Constituem o grupo dos micro-organismos os vírus, bactérias, fungos, algas e protozoários. Uma célula microbiana isolada pode apresentar existência independente. As células são estruturas organizadas, possuem um conjunto de quatro componentes essenciais: proteínas, ácido nucleico, lipídios e polissacarídeos (MADIGAN et al., 2010).

Segundo os mesmos autores, pode-se promover o crescimento de células microbianas em meios de cultura artificiais, onde se desenvolvem em grandes proporções, tornando possível a realização de estudos bioquímicos e genéticos.

Quando se encontram em um meio que possui condições favoráveis para seu desenvolvimento, com o fornecimento de nutrientes para o funcionamento do seu metabolismo, os micro-organismos iniciam o processo de multiplicação. Alimentos são fontes de nutrientes, razão pela qual são extremamente favoráveis para multiplicação microbiana. O metabolismo microbiano muitas vezes pode causar alterações indesejáveis nos alimentos, causadas por micro-organismos deteriorantes, além da produção de toxinas que fazem mal a saúde e bem estar humana, consequência da ação de micro-organismos patogênicos. Contudo, existem os micro-organismos de caráter benéfico, que causam alterações nos alimentos promovendo a transformação de suas características originais (HOFFEMANN, 2001; GEITENES et al., 2013).

O metabolismo de micro-organismos patogênicos dá origem a toxinas prejudiciais à saúde e bem estar humano. Quando esses micro-organismos desenvolvem-se em contato com o alimento, este acaba por tornar-se o veículo do patógeno para o organismo humano. Bactérias como *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, *Staphylococcus aureus* são exemplos de micro-organismos patogênicos produtores de toxinas, que muitas vezes acometem alimentos e acabam contaminado o homem (STAMFORD et al., 2006).

A ação de micro-organismos maléficos prejudica a integridade de alimentos, sendo necessário o controle da carga microbiana a partir da adição de substâncias que irão inibir, ou seja, tornar o meio impróprio para o crescimento destes micro-organismos (SOUZA, 2006).

4.5 SINERGISMO ENTRE ÓLEO ESSENCIAL E AGENTES ANTIMICROBIANOS

De acordo com Gutierrez et al (2008), os óleos essenciais quando combinados com outras substâncias podem ter como resultado o mesmo potencial evidenciado para óleos isolados, contudo, em menores concentrações. Este fato favorece o emprego dos mesmos como antimicrobianos utilizados na conservação de alimentos, onde a ação conjunta de diferentes compostos químicos fornece a possibilidade de controle de bactérias

multirresistentes. Os estudos realizados por Zago et al. (2009) dão origem à possibilidade de utilização de óleos essenciais combinados aos antimicrobianos tradicionais, com um aumento no potencial da droga. Os autores relataram que mesmo óleos essenciais que não demonstraram muita eficiência na inibição do crescimento microbiano, ao serem associados a produtos sintéticos, apresentaram sinergismo.

Um novo método conservacionista de alimentos, conhecido como “sistema antimicrobiano natural” está sendo descrito em estudos, sendo este embasado na aplicação de sinergismo de compostos de origem animal, microbiana e/ou vegetal de comprovados potenciais antimicrobianos com técnicas físicas de conservação, sendo que esta combinação proporciona a formação de um ambiente impróprio para o desenvolvimento de microorganismos (HARRIS, 2003; SOUZA, 2006).

A interação entre óleos essenciais e outras substâncias evidencia uma alternativa para a potencialidade da ação dos mesmos. Harris et al. (2003) analisaram o efeito da combinação efetiva entre óleos de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e a fração polar de manuka (*Leptospermum scoparium*). Como resultado, observaram o aumento da ação bactericida quando comparada à ação dos óleos individualmente. Este estudo pode explicar o sinergismo ocorrente entre os componentes presentes nos óleos essenciais e outras substâncias de caráter diferente, como antibióticos ou conservantes químicos, sendo que a diferença nos mecanismos de ação das substâncias de caráter distinto quando utilizadas em conjunto promove a ação em menor tempo. Substâncias que agem na membrana celular podem facilitar a entrada de substâncias que têm ação em outros processos no interior da célula, maximizando, portanto, a ação bactericida (KNOWLES et al., 2005).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento *in vitro* e as análises foram realizados no laboratório de microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *campus* Toledo, localizado na cidade de Toledo, Paraná.

5.1 Micro-organismos

Foram utilizados micro-organismos comumente veiculados por alimentos, liofilizados, adquiridos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). Foram utilizadas as bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e bactérias Gram-negativas: *Salmonella typhi* (ATCC 06539) e *Escherichia coli* (ATCC 10536).

5.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de canela (lote 215), gengibre (lote 267), hortelã (lote 182), melaleuca (lote 191) e tangerina (lote 142) foram obtidos da empresa Dádiva Brasil aromaterapia, especializada na comercialização destes produtos. Foram exigidos laudos técnicos dos laboratórios fornecedores, com a intenção de caracterizar cada óleo.

5.3 Conservantes químicos

Os conservantes químicos utilizados foram metilparabeno da marca Biotec (Lote 32343), de nome químico éster metílico do ácido 4-hidroxibenzóico e ácido acético glacial Alphatec (Lote 21466-1), de nome químico ácido acético, que possuem ação germicida, bacteriostática e fungistática.

5.4 Preparo das soluções e inóculo

As soluções de óleos essenciais foram preparadas em eppendorfs estéreis. Para o preparo de 1 mL de solução de óleo essencial, adicionou-se 900 µL de caldo Müeller-Hinton,

100 μL de dimetilsulfoxido (DMSO), 10 mg de óleo essencial, para uma solução resultante com concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de óleo essencial.

O inóculo para os testes de diluição foi preparado de acordo com a escala 0,5 de McFarland.

De acordo com a National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003), para o preparo da solução 0,5 McFarland, uma alíquota de 0,5 mL de BaCl_2 0,048 mol/L (1,175% (p)/v $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foi acrescentada a 99,5 mL de H_2SO_4 0,18 mol/L (1% v/v), sob constante agitação para manter a suspensão.

A suspensão de sulfato de bário foi então transferida, em alíquotas de 5 mL, para tubos com tampas. Esses tubos permaneceram armazenados em local escuro a temperatura ambiente. O tubo passou por vigorosa agitação antes de ser utilizado.

5.5 Determinação da concentração inibitória mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para bactérias, realizou-se o teste de microdiluição em microplacas KASVI® para cultura de células, estéreis, descartáveis, com 96 poços.

De acordo com a metodologia descrita pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003), adicionou-se 100 μL de caldo Müeller-Hinton, com o auxílio de uma micropipeta multicanal, em todos os poços da placa. O óleo essencial a ser testado ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi adicionado à primeira linha de poços da microplaca. Em seguida, realizaram-se diluições seriadas do óleo essencial, sendo que o poço seguinte apresentava a metade da concentração do poço imediatamente anterior.

Realizou-se o ajuste da turbidez da cultura em caldo com crescimento ativo com solução salina estéril, de modo a obter-se uma turbidez ótica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. A suspensão resultante possui aproximadamente de 1 a 2×10^8 UFC/mL. Foram realizadas diluições 1:20, para obtenção de uma solução com aproximadamente $0,5 \times 10^7$ UFC mL^{-1} , com o auxílio de uma solução salina 0,85%. Inoculou-se, com a ajuda de uma micropipeta, 10 μL da suspensão bacteriana em cada poço das respectivas microplacas, com exceção da fileira onde foi feito o controle da esterilidade do caldo. As microplacas foram incubadas a 35°C , por 24 horas.

Após o tempo de incubação, realizou-se a leitura das placas, observando a presença ou ausência de crescimento bacteriano visível. Com leve agitação, para simplificar a leitura dos pontos finais, observou-se qual o último poço isento de crescimento bacteriano visível. O último poço que possui a característica de ser óticamente claro, ou seja, onde houver ausência de turvação visível, é tido como a mínima concentração que inibe o crescimento bacteriano, ou seja, é a CIM. O experimento foi realizado em duplicata.

5.6 Determinação da concentração bactericida mínima.

A determinação da CBM foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Baron et al. (1994). Foram retiradas alíquotas de 10 μL , de forma asséptica, dos poços da microplaca que correspondem a CIM e as 5 concentrações imediatamente anteriores. Em seguida, estas foram semeadas, com auxílio de alças bacteriológicas, pelo método de espalhamento em estrias, na superfície de ágar Müeller-Hinton estéril contido em placas de Petri devidamente esterilizadas. As placas foram posteriormente incubadas a 35°C por 24 horas, sendo realizada em seguida a contagem das colônias que cresceram sob o meio sólido. Considerou-se como CBM a menor concentração de óleo essencial que ocasionou uma redução no crescimento bacteriano igual ou superior a 99,9% do inóculo inicial.

5.7 Associação do óleo essencial com conservante químico

Os óleos essenciais que apresentaram melhor desempenho de inibição foram submetidos ao teste de sinergismo com as substância química conservantes comumente utilizada em alimento (metilparabeno e ácido acético), através da técnica de “checkerboard”, para derivação do índice de concentração inibitória fracionada.

Utilizaram-se as soluções de óleos essenciais de acordo com as respectivas CIM. Primeiramente, adicionou-se às microplacas estéreis de 96 cavidades 100 μL de caldo Müeller-Hinton estéril. Posteriormente, transferiu-se alíquotas de 100 μL das soluções de óleo essencial a serem testadas nos sete primeiros poços da primeira linha, na concentração de

8xCIM, onde diluiu-se, no sentido vertical, de forma a ter concentrações nas colunas com os respectivos valores de CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8. Em seguida, adicionou-se, da primeira coluna até a sétima, 100 µL da solução conservante, mantendo a concentração fixa no sentido vertical, sendo que no primeiro poço até o último poço da primeira coluna adicionou-se a solução de conservante químico CIM/8, até CIMx8 na última coluna de óleo essencial, respectivamente. Em seguida, adicionou-se alíquotas de 10 µL da suspensão bacteriana já padronizada, nos poços das microplacas. Estas foram então incubadas por 24 horas, a 35°C.

Para o cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), realizou-se a soma de $CIF^A + CIF^B$, sendo que A representa o óleo essencial e B o conservante químico. A determinação de CIF^A foi feita a partir da divisão de CIM^A combinada por CIM^A sozinha, assim como CIF^B foi obtida através do quociente de CIM^B combinada por CIM^B sozinha. Desta forma, a classificação do ICIF de acordo com a atividade dos óleos conjunta ao conservante químico é classificada em sinérgica ($\leq 0,5$), aditiva (entre 0,5 e 1,0), indiferente (entre 1,0 e 4,0) ou antagônica ($>4,0$) (LEWIS et al., 2002).

Os resultados do checkerboard são interpretados pelo padrão formado pelo isoblograma. As concentrações de uma das substâncias fica ao longo do eixo X e a outra ao longo do eixo Y. Ao conectar a série de pontos relacionados com a combinação das duas substâncias onde ocorre inibição do crescimento, obtém-se o isoblograma.

Os dados foram submetidos à análise de variância entre os valores de CIM e CBM. No caso de resposta significativa, realizou-se o teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme os resultados dos testes para determinação da concentração inibitória mínima (Tabela 1) pode-se perceber a eficiência dos óleos essenciais e conservantes químicos contra as bactérias testadas. No caso dos óleos testados neste trabalho, apenas o óleo essencial de tangerina não apresentou resultados positivos em nenhum dos casos.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de óleos essenciais e conservantes químicos contra bactérias patogênicas veiculadas por alimentos e seus respectivos desvios padrões (DP).

Micro-organismos	Canela	Gengibre	Hortelã	Melaleuca	Metilparabeno	Ácido acético
	CIM ± DP (mg.mL ⁻¹)					
<i>Bacillus cereus</i>	0,391 ± 0,16 a	2,19 ± 0,21 ab	5,00 ± 0,0 c	2,81 ± 1,19 bc	1,87 ± 0,0 ab	1,62 ± 0,0 ab
<i>Escherichia coli</i>	0,261 ± 0,31 a	2,50 ± 0,0 b	5,00 ± 0,0 c	1,04 ± 0,29 a	0,937 ± 0,0 a	1,62 ± 0,0 b
<i>Salmonella typhi</i>	0,351 ± 0,32 a	2,19 ± 0,59 a	5,00 ± 0,0 b	3,44 ± 1,18 b	0,470 ± 0,0 a	1,62 ± 0,0 a
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,625 ± 0,0 a	2,50 ± 0,0 c	0,00 ± 0,0 -	2,50 ± 0,0 c	3,70 ± 0,0 d	1,62 ± 0,0 bc

Médias seguidas por diferentes letras na linha, diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores referentes à concentração bactericida mínima dos óleos essenciais estão apresentados na Tabela 2. O óleo de tangerina teve ausência de efeito.

Tabela 2. Concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais contra bactérias patogênicas veiculadas por alimentos e seus respectivos desvios padrões (DP).

Micro-organismos	Canela	Gengibre	Hortelã	Melaleuca
	CBM ± DP (mg.mL ⁻¹)			
<i>Bacillus cereus</i>	0,703 ± 0,29 a	2,27 ± 0,59 b	5,00 ± 0,0 c	5,00 ± 0,0 c
<i>Escherichia coli</i>	1,25 ± 0,0 a	5,00 ± 0,0 b	5,00 ± 0,0 b	5,00 ± 0,0 b
<i>Salmonella typhi</i>	1,41 ± 0,59 a	5,00 ± 0,0 b	5,00 ± 0,0 b	4,37 ± 1,19 b
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,25 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 -	0,0 ± 0,0 -	0,0 ± 0,0 -

Médias seguidas por diferentes letras na linha diferem entre si de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O óleo essencial de canela foi o responsável pela inibição do crescimento bacteriano em menores concentrações quando comparado com os demais óleos testados, ou seja, apresentou o maior potencial antimicrobiano. Dentre as bactérias testadas, a *Escherichia coli* foi a mais sensível ao óleo essencial de canela (0,261 mg.mL⁻¹), necessitando da menor concentração de óleo para inibição do metabolismo, seguida por *Salmonella typhi* (0,351 mg.mL⁻¹), *Bacillus cereus* (0,391 mg.mL⁻¹) e *Staphylococcus aureus* (0,625 mg.mL⁻¹). Com relação à concentração bactericida mínima, ou seja, a mínima concentração do óleo essencial suficiente para causar a morte da célula bacteriana, o óleo essencial de canela apresentou o maior potencial bactericida, sendo mais eficaz frente a *Bacillus cereus* (0,703 mg.mL⁻¹), seguida por *Escherichia coli* (1,25 mg.mL⁻¹) e *Staphylococcus aureus* (1,25 mg.mL⁻¹), ambas com a mesma concentração, e por fim, *Salmonella typhi* (1,41 mg.mL⁻¹).

A alta eficácia do óleo essencial de canela frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas neste trabalho pode ser justificada pela composição do mesmo, no qual apresenta 81% de cinamaldeído, sendo este composto o principal responsável pelo seu alto potencial antimicrobiano. Tais resultados corroboram com os estudos de Chao et al. (2000), onde baixas concentrações do óleo foram capazes de inibir o crescimento das mesmas bactérias. Oussalah et al. (2007) constataram a presença do cinamaldeído como composto majoritário e também evidenciaram seu efeito antimicrobiano frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Evidências indicam que a ação antimicrobiana do cinamaldeído e do eugenol está relacionada com a inibição de enzimas essenciais no metabolismo bacteriano, causando danos à parede celular e consequente morte da célula (DI PASQUA et al., 2007).

As concentrações mínimas de inibição microbiana dos óleos essenciais de gengibre, o qual apresenta 33% zingibereno, composto majoritário, e melaleuca, cuja atividade antimicrobiana é atribuída aos 42% terpen-4-ol encontrados na sua composição, foram relativamente próximas, sendo que a menor concentração do óleo essencial de gengibre (2,19 mg.mL⁻¹) foi responsável pela inibição do crescimento das bactérias *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi*, seguidas por *Escherichia coli* (2,50 mg.mL⁻¹) e *Staphylococcus aureus* (2,50 mg.mL⁻¹). O óleo essencial de gengibre foi o segundo com potencial bactericida mais eficaz, sendo que sua ação mais significativa se deu frente à bactéria *Bacillus cereus* (2,27 mg.mL⁻¹). A concentração máxima testada promoveu a morte das cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Não foi eficaz frente às cepas de *Staphylococcus aureus*.

Os resultados estão de acordo com Sivasothy et al., (2011), que evidenciou a ação antimicrobiana do óleo essencial de gengibre frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, obtendo resultados satisfatórios. Na composição do óleo essencial de gengibre, encontram-se presentes o óxido de cariofileno, α -pineno, α -terpineol, linalol, 1,8-cineol, compostos que possuem características antimicrobianas conhecidas. Apesar de estarem contidos em baixas concentrações, a ocorrência de efeito sinérgico entre eles aumenta o potencial antimicrobiano (GILES; ZHAO; AGBOOLA, 2010).

O óleo essencial de melaleuca inibiu com maior intensidade a bactéria *Escherichia coli* (1,04 mg.mL⁻¹), *Staphylococcus aureus* (2,50 mg.mL⁻¹), *Bacillus cereus* (2,81 mg.mL⁻¹) e *Salmonella typhi* (3,44 mg.mL⁻¹) respectivamente. O óleo de melaleuca teve efeito bactericida nas concentrações máximas com relação às cepas de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, sendo a *Salmonella typhi* relativamente mais sensível (4,37 mg.mL⁻¹). Não houve morte celular nas cepas de *Staphylococcus aureus*.

Thomsen et al. (2013) identificaram o potencial do óleo essencial de melaleuca frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Cox et al. (2000) obtiveram resultados semelhantes para o óleo essencial de melaleuca, sendo que *Escherichia coli* também apresentou-se mais suscetível aos efeitos do óleo. A ação do óleo essencial de melaleuca, em concentrações mínimas, promove a inibição da respiração celular e causa vazamento de potássio das células, danificando a estrutura da membrana celular. A barreira de permeabilidade mantém função vital para a manutenção do metabolismo celular. As membranas citoplasmáticas, o plasma e as membranas mitocondriais promovem uma barreira na passagem de pequenos íons como H^+ , K^+ , Na^+ , permitindo que as organelas controlem a entrada e saída destes componentes. A danificação desta barreira de permeabilidade compromete de forma letal a célula bacteriana.

O óleo essencial de hortelã se mostrou eficaz apenas na concentração máxima testada (5 mg.mL^{-1}), exceto para *Staphylococcus aureus*, a qual não teve o crescimento comprometido, caracterizando o baixo e/ou inexistente comprometimento do seu metabolismo frente ação do óleo essencial de hortelã. Com relação à concentração bactericida mínima, foi eficaz na máxima concentração testada, frente às cepas de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhi* e não apresentou potencial bactericida sobre *Staphylococcus aureus*.

De acordo com Tyagia e Malika (2011), que obtiveram resultados semelhantes para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, o potencial antimicrobiano do óleo essencial de hortelã está relacionado à presença dos compostos mentol e mentona, presentes em grande quantidade. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana conhecida. Contudo, os estudos de Yadegarinia et al. (2006) revelaram alta propriedade antimicrobiana do óleo essencial de hortelã com baixas concentrações de mentol, mas altas concentrações de outros compostos, tais como α -terpeno, iso-mentona, trans-carveol, óxido de pipertinona oxide e β -caryofileno. A ação sinérgica destes compostos pode ter contribuído de forma significativa para um aumento no potencial antimicrobiano.

O óleo essencial de tangerina possui sua composição caracterizada pelo composto majoritário limoneno. Lorenzetti et al. (2011) também evidenciaram a ineficácia do óleo essencial de tangerina como antimicrobiano, revelando, inclusive, a baixa atividade antimicrobiana do limoneno mesmo como composto purificado.

O conservante metilparabeno foi eficaz quando testado frente à *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*, em ordem crescente de sensibilidade. A bactéria menos sensível ao conservante foi *Staphylococcus aureus*, que apresentou um valor elevado de CIM. Devido a este fato, não foram realizados testes de associação entre os óleos essenciais e o

conservante metilparabeno para identificar diferença na sensibilidade de *Staphylococcus aureus*, uma vez que a metodologia exige que os testes sejam feitos com uma quantidade muito maior do conservante, o que ocasionaria dificuldades de solubilização, necessitando adição de quantidades muito grandes de emulsificante, o que comprometeria os resultados, uma vez que o emulsificante em quantidades muito elevadas é tóxico para as bactérias.

As bactérias apresentaram o mesmo valor de CIM quando testadas com ácido acético, indicando que a possível ação bactericida deste conservante se dê pelo abaixamento do pH.

Os valores de concentração inibitória mínima obtidos por meio dos testes de associação entre óleo essencial de canela e o conservante metilparabeno frente às bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi* estão expressos na Figura 1.

(a)		Metilparabeno (mg.mL ⁻¹)							
Óleo essencial de canela (mg.mL ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	
	A	2,088	2,088	2,088	2,088	2,088	2,088	2,088	2,088
		0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	
	B	1,044	1,044	1,044	1,044	1,044	1,044	1,044	1,044
		0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	
	C	0,522	0,522	0,522	0,522	0,522	0,522	0,522	0,522
		0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	
	D	0,261	0,261	0,261	0,261	0,261	0,261	0,261	0,261
	0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50		
E	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130	0,130	
	0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50		
F	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	0,065	
	0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50		
G	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032	
	0,117	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50		

(b)		Metilparabeno (mg.mL ⁻¹)							
Óleo essencial de canela (mg.mL ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	
	A	2,81	2,81	2,81	2,81	2,81	2,81	2,81	2,81
		0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76	
	B	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
		0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76	
	C	0,702	0,702	0,702	0,702	0,702	0,702	0,702	0,702
		0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76	
	D	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351	0,351
	0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76		
E	0,176	0,176	0,176	0,176	0,176	0,176	0,176	0,176	
	0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76		
F	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	0,088	
	0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76		
G	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	0,044	
	0,059	0,117	0,235	0,470	0,940	1,88	3,76		

(c)		Metilparabeno (mg.mL ⁻¹)							
Óleo essencial de canela (mg.mL ⁻¹)		1	2	3	4	5	6	7	
	A	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13	3,13
		0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15	
	B	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56	1,56
		0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15	
	C	0,782	0,782	0,782	0,782	0,782	0,782	0,782	0,782
		0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15	
	D	0,391	0,391	0,391	0,391	0,391	0,391	0,391	0,391
	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15		
E	0,196	0,196	0,196	0,196	0,196	0,196	0,196	0,196	
	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15		
F	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	
	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15		
G	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	0,049	
	0,234	0,469	0,937	1,87	3,75	7,50	15		

Figura 1: Esquemas do ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de canela e conservante metilparabeno frente às bactérias *Escherichia coli* (a), *Salmonella typhi* (b) e *Bacillus cereus* (c). A região em vermelho evidencia a CIM da associação e a região acinzentada caracteriza crescimento microbiano visível.

Para *Escherichia coli* (a) não foi evidenciado crescimento microbiano visível mesmo nas menores concentrações de óleo e conservante testadas (CIM/8). Verifica-se que a CIM do conservante reduziu de 0,937 mg mL⁻¹ para 0,117 mg.mL⁻¹ quando associada a 0,032 mg.mL⁻¹ de óleo essencial de canela com possibilidade de maiores reduções. Zago et al. (2009), ao testarem óleo essencial de canela em conjunto com antibióticos obteve resultados que apontam para o sinergismo frente a bactéria *Escherichia coli*.

Houve grande redução na concentração inibitória mínima do conservante quando associado a uma baixa concentração do óleo essencial de canela. Portanto, concentrações levemente mais elevadas de óleo essencial podem reduzir ainda mais a concentração do conservante, permitindo que este seja empregado em menor quantidade ($<0,117 \text{ mg.mL}^{-1}$) sem que ocorra comprometimento da qualidade microbiológica do produto.

No caso da bactéria *Salmonella typhi* (b), o valor de CIM do conservante reduziu de $0,470 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $0,059 \text{ mg.mL}^{-1}$ com a adição de $0,088 \text{ mg.mL}^{-1}$ de óleo essencial de canela. O crescimento microbiano visível foi evidenciado apenas no poço onde a presença dos compostos antimicrobianos se encontrava com a menor concentração testada possível.

Ambas as bactérias testadas são Gram-negativas, tendo estes fatos em vista, possivelmente, a parede celular mais delgada, possuidora de lipopolissacarídeos e lipoproteínas facilitou a entrada destes compostos, uma vez que ambos são lipossolúveis. Estas duas bactérias Gram-negativas são consideradas fisiologicamente relacionadas, compartilham características. Possuem semelhança em genes relacionados com processos celulares importantes. Contudo, pesquisas evidenciam a existência de divergência em genes relacionados com processos metabólicos, sendo que em ambas as espécies estes são regulados de forma diferente. Essa diferença acarreta divergência nos processos metabólicos, embora compartilhem do mesmo tipo de parede celular. Desta forma, os antimicrobianos tiveram consequências diferentes em ambas as espécies testadas, sendo a *Escherichia coli* mais sensível do que *Salmonella typhi* (MEYSMAN et al., 2013).

Como evidenciado na Figura 1 – (c), quando testados com a bactéria *Bacillus cereus*, a concentração inibitória mínima do metilparabeno reduziu de $1,87 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $0,234 \text{ mg.mL}^{-1}$. Já o óleo essencial de canela teve sua concentração reduzida de $0,391 \text{ mg.mL}^{-1}$ para $0,196 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Nota-se que a concentração inibitória da associação foi maior do que os testes com *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Bactérias Gram-positivas, por possuírem uma espessa camada de peptídeoglicano, dificultam a entrada desses compostos na célula.

O isoblograma apresentado na Figura 2 está relacionado ao comportamento evidenciado na Figura 1 – (c). As concentrações inibitórias mínimas permitiram a elaboração de uma curva que evidencia geometricamente o comportamento aditivo resultante da associação entre óleo essencial de canela e metilparabeno frente à bactéria *Bacillus cereus*.

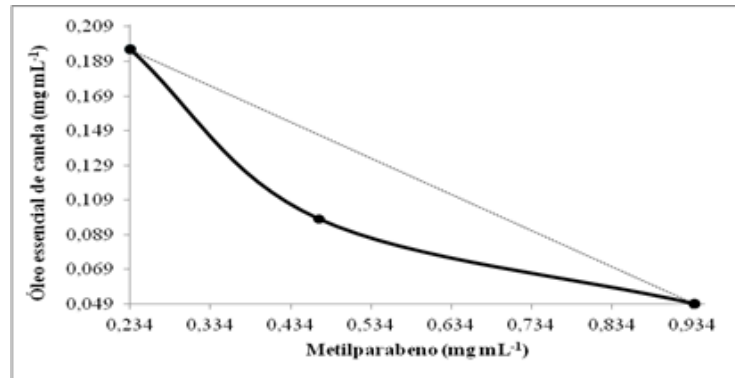


Figura 2: Isobolograma obtido por meio da associação entre óleo essencial de canela e metilparabeno contra a bactéria *Bacillus cereus*. A linha pontilhada indica o comportamento aditivo teórico.

Os valores de concentração inibitória mínima obtidos nos testes de associação entre metilparabeno e óleo essencial de canela para as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*, conforme apresentados anteriormente nas figuras esquematizadas, não permitiram a elaboração de uma curva para evidenciar geometricamente a existência de sinergismo entre estas duas substâncias, por serem extremamente baixos. Contudo, foi possível a elaboração do isobolograma para o teste com *Bacillus cereus*, cujo efeito resultado da associação é evidenciado como aditivo. Conforme pode ser visto na Figura 2, a curva que não se distancia muito da linha aditiva teórica confirma este comportamento. O ICIF (Índice de concentração inibitória fracionada) foi calculado para os testes descritos acima. Como resultado, para o teste com *Bacillus cereus* ICIF = 0,62, confirmando o efeito aditivo. Para os testes com *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* os valores de ICIF foram 0,25 e 0,37, respectivamente, evidenciando o efeito sinérgico entre estes componentes.

O óleo essencial de canela tem ação em enzimas que atuam na parede celular, portanto, agem danificando-a. A literatura propõe que os parabenos atuam no mecanismo transportador de elétrons da célula. Ao comprometerem este mecanismo, os parabenos comprometem a respiração celular e todos os processos vitais para o funcionamento da célula, como a síntese de DNA e RNA, funcionamento de enzimas essenciais, mecanismos de transporte pelas membranas. Desta forma, a ação do óleo essencial de canela foi mais eficaz na parede celular das bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*), por serem mais delgadas e ter sua entrada facilitada por lipoproteínas e lipopolissacarídeos, permitindo ação mais rápida do metilparabeno, necessitando de menores concentrações de ambas as substâncias quando comparado com a bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* (HARRIS, 2003; DI PASQUA et al., 2007; FERNANDES et al., 2013).

Os resultados referentes aos testes de associação entre o óleo essencial de melaleuca e o conservante metilparabeno com as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi* estão expressos da Figura 3.

(a)		Metilparabeno (mg.mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de melaleuca (mg.mL ⁻¹)	A	2,81 0,117	2,81 0,234	2,81 0,469	2,81 0,937	2,81 1,87	2,81 1,88	2,81 7,5
	B	1,40 0,117	1,40 0,234	1,40 0,469	1,40 0,937	1,40 1,87	1,40 1,88	1,40 7,5
	C	0,702 0,117	0,702 0,234	0,702 0,469	0,702 0,937	0,702 1,87	0,702 1,88	0,702 7,5
	D	0,351 0,117	0,351 0,234	0,351 0,469	0,351 0,937	0,351 1,87	0,351 1,88	0,351 7,5
	E	0,176 0,117	0,176 0,234	0,176 0,469	0,176 0,937	0,176 1,87	0,176 1,88	0,176 7,5
	F	0,088 0,117	0,088 0,234	0,088 0,469	0,088 0,937	0,088 1,87	0,088 1,88	0,088 7,5
	G	0,044 0,117	0,044 0,234	0,044 0,469	0,044 0,937	0,044 1,87	0,044 1,88	0,044 7,5

(b)		Metilparabeno (mg.mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de melaleuca (mg.mL ⁻¹)	A	22,4 0,234	22,4 0,469	22,4 0,937	22,4 1,87	22,4 3,75	22,4 7,5	22,4 15
	B	11,2 0,234	11,2 0,469	11,2 0,937	11,2 1,87	11,2 3,75	11,2 7,5	11,2 15
	C	5,6 0,234	5,6 0,469	5,6 0,937	5,6 1,87	5,6 3,75	5,6 7,5	5,6 15
	D	2,8 0,234	2,8 0,469	2,8 0,937	2,8 1,87	2,8 3,75	2,8 7,5	2,8 15
	E	1,4 0,234	1,4 0,469	1,4 0,937	1,4 1,87	1,4 3,75	1,4 7,5	1,4 15
	F	0,700 0,234	0,700 0,469	0,700 0,937	0,700 1,87	0,700 3,75	0,700 7,5	0,700 15
	G	0,350 0,234	0,350 0,469	0,350 0,937	0,350 1,87	0,350 3,75	0,350 7,5	0,350 15

(c)		Metilparabeno (mg.mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de melaleuca (mg.mL ⁻¹)	A	27 0,059	27 0,117	27 0,235	27 0,470	27 0,940	27 1,88	27 3,76
	B	13,5 0,059	13,5 0,117	13,5 0,235	13,5 0,470	13,5 0,940	13,5 1,88	13,5 3,76
	C	6,75 0,059	6,75 0,117	6,75 0,235	6,75 0,470	6,75 0,940	6,75 1,88	6,75 3,76
	D	3,37 0,059	3,37 0,117	3,37 0,235	3,37 0,470	3,37 0,940	3,37 1,88	3,37 3,76
	E	1,69 0,059	1,69 0,117	1,69 0,235	1,69 0,470	1,69 0,940	1,69 1,88	1,69 3,76
	F	0,844 0,059	0,844 0,117	0,844 0,235	0,844 0,470	0,844 0,940	0,844 1,88	0,844 3,76
	G	0,422 0,059	0,422 0,117	0,422 0,235	0,422 0,470	0,422 0,940	0,422 1,88	0,422 3,76

Figura 3: Esquemas do ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de melaleuca e conservante metilparabeno frente às bactérias *Escherichia coli* (a), *Bacillus cereus* (b) e *Salmonella typhi* (c). A região em vermelho evidencia a CIM da associação e a região acinzentada caracteriza crescimento microbiano visível.

Para a bactéria *Escherichia coli*, a associação entre o óleo essencial de melaleuca e o conservante metilparabeno comprometeu negativamente a CIM do óleo, que passou de 0,351 mg.mL⁻¹ para 1,40 mg.mL⁻¹.

O mesmo comportamento se manteve nos testes com *Bacillus cereus* (b), onde o valor de CIM do óleo essencial de melaleuca aumentou de 2,8 mg.mL⁻¹ para 5,6 mg.mL⁻¹ ao entrar em contato com 0,234 mg.mL⁻¹ de metilparabeno.

Ao calcular o ICIF, os valores resultantes foram: 4,12 para os testes com *Escherichia coli* e 2,1 para *Bacillus cereus*. Estes valores caracterizam antagonismo e indiferença na associação, respectivamente.

Como evidenciado na Figura 3 – (c), no teste com *Salmonella typhi* a CIM do óleo essencial combinado teve um grande aumento quando comparada com a CIM do óleo sozinho, de 3,37 mg.mL⁻¹ para 13,5 mg.mL⁻¹. Ao calcular o ICIF, o valor resultante foi 4,12, evidenciando a presença de antagonismo na associação entre essas duas substâncias, uma vez que o metilparabeno comprometeu significativamente a CIM do óleo essencial de melaleuca isolado.

A Figura 4 evidencia graficamente a existência de indiferença (para bactéria *Bacillus cereus*) e antagonismo (para as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) nas associações entre óleo essencial de melaleuca e metilparabeno.

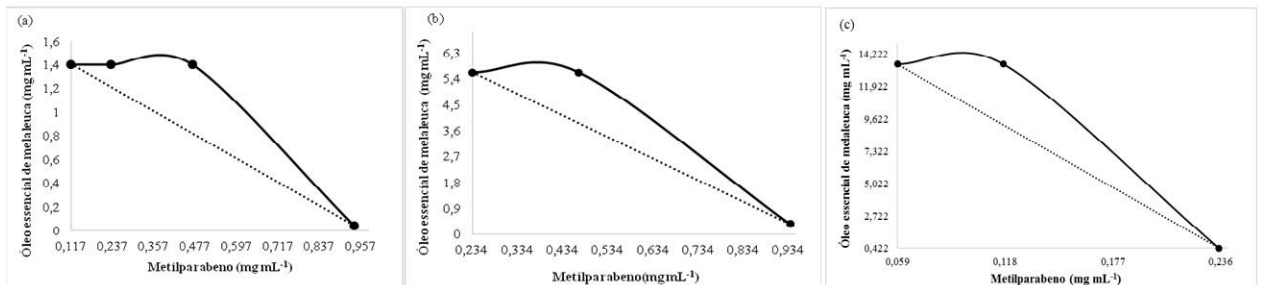


Figura 4: Isobogramas representando a relação entre óleo essencial de melaleuca e metilparabeno para *Escherichia coli* (a), *Bacillus cereus* (b) e *Salmonella typhi* (c). A linha pontilhada indica atividade aditiva teórica.

As curvas dos isobogramas (a) e (c), correspondentes aos testes com as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*, respectivamente, apresentam-se mais deslocadas da linha aditiva teórica, comprovando a existência de antagonismo na associação. A curva (b), referente ao teste com *Bacillus cereus* apresenta-se menos afastada da linha aditiva teórica do que as outras duas, porém não encontra-se próxima da mesma, evidenciando indiferença na associação.

Nos estudos de Rosato et al. (2007), o efeito da associação entre óleo essencial de melaleuca e uma droga antimicrobiana também obteve resultados semelhantes, onde houve efeito antagônico e indiferente entre o óleo essencial e a droga testada frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O componente majoritário do óleo essencial de melaleuca é o terpen-4-ol, cujo mecanismo de ação já foi descrito anteriormente. Ao entrar em contato com o metilparabeno, a concentração inibitória mínima do óleo essencial de melaleuca ficou negativamente comprometida, embora tenha se apresentado satisfatória quando testado isoladamente. É

possível que a ineficácia na inibição do crescimento microbiano quando essas substâncias foram associadas se deu pela incompatibilidade entre o terpen-4-ol e o metilparabeno, ou, ainda, incompatibilidade entre os compostos minoritários e o metilparabeno (HARRIS, 2007).

A associação entre óleo essencial de canela com ácido acético e melaleuca com ácido acético teve o comportamento semelhante quando associado às bactérias testadas.

A Figura 5 comporta os quatro esquemas referentes teste checkerboard com os resultados de CIM das associações entre óleo essencial de canela e ácido acético frente às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi*.

(a)		Ácido acético (mg mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de canela (mg mL ⁻¹)	A	2,08 0,203	2,08 0,406	2,08 0,812	2,08 1,62	2,08 3,25	2,08 6,50	2,08 13,0
	B	1,04 0,203	1,04 0,406	1,04 0,812	1,04 1,62	1,04 3,25	1,04 6,50	1,04 13,0
	C	0,522 0,203	0,522 0,406	0,522 0,812	0,522 1,62	0,522 3,25	0,522 6,50	0,522 13,0
	D	0,261 0,203	0,261 0,406	0,261 0,812	0,261 1,62	0,261 3,25	0,261 6,50	0,261 13,0
	E	0,130 0,203	0,130 0,406	0,130 0,812	0,130 1,62	0,130 3,25	0,130 6,50	0,130 13,0
	F	0,065 0,203	0,065 0,406	0,065 0,812	0,065 1,62	0,065 3,25	0,065 6,50	0,065 13,0
	G	0,033 0,203	0,033 0,406	0,033 0,812	0,033 1,62	0,033 3,25	0,033 6,50	0,033 13,0

(b)		Ácido acético (mg mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de canela (mg mL ⁻¹)	A	5,00 0,203	5,00 0,406	5,00 0,812	5,00 1,62	5,00 3,25	5,00 6,50	5,00 13,0
	B	2,50 0,203	2,50 0,406	2,50 0,812	2,50 1,62	2,50 3,25	2,50 6,50	2,50 13,0
	C	1,25 0,203	1,25 0,406	1,25 0,812	1,25 1,62	1,25 3,25	1,25 6,50	1,25 13,0
	D	0,625 0,203	0,625 0,406	0,625 0,812	0,625 1,62	0,625 3,25	0,625 6,50	0,625 13,0
	E	0,312 0,203	0,312 0,406	0,312 0,812	0,312 1,62	0,312 3,25	0,312 6,50	0,312 13,0
	F	0,156 0,203	0,156 0,406	0,156 0,812	0,156 1,62	0,156 3,25	0,156 6,50	0,156 13,0
	G	0,078 0,203	0,078 0,406	0,078 0,812	0,078 1,62	0,078 3,25	0,078 6,50	0,078 13,0

(c)		Ácido acético (mg mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de canela (mg mL ⁻¹)	A	3,13 0,203	3,13 0,406	3,13 0,812	3,13 1,62	3,13 3,25	3,13 6,50	3,13 13,0
	B	1,56 0,203	1,56 0,406	1,56 0,812	1,56 1,62	1,56 3,25	1,56 6,50	1,56 13,0
	C	0,782 0,203	0,782 0,406	0,782 0,812	0,782 1,62	0,782 3,25	0,782 6,50	0,782 13,0
	D	0,391 0,203	0,391 0,406	0,391 0,812	0,391 1,62	0,391 3,25	0,391 6,50	0,391 13,0
	E	0,196 0,203	0,196 0,406	0,196 0,812	0,196 1,62	0,196 3,25	0,196 6,50	0,196 13,0
	F	0,098 0,203	0,098 0,406	0,098 0,812	0,098 1,62	0,098 3,25	0,098 6,50	0,098 13,0
	G	0,049 0,203	0,049 0,406	0,049 0,812	0,049 1,62	0,049 3,25	0,049 6,50	0,049 13,0

(d)		Ácido acético (mg mL ⁻¹)						
		1	2	3	4	5	6	7
Óleo essencial de canela (mg mL ⁻¹)	A	3,76 0,203	3,76 0,406	3,76 0,812	3,76 1,62	3,76 3,25	3,76 6,50	3,76 13,0
	B	1,88 0,203	1,88 0,406	1,88 0,812	1,88 1,62	1,88 3,25	1,88 6,50	1,88 13,0
	C	0,940 0,203	0,940 0,406	0,940 0,812	0,940 1,62	0,940 3,25	0,940 6,50	0,940 13,0
	D	0,470 0,203	0,470 0,406	0,470 0,812	0,470 1,62	0,470 3,25	0,470 6,50	0,470 13,0
	E	0,235 0,203	0,235 0,406	0,235 0,812	0,235 1,62	0,235 3,25	0,235 6,50	0,235 13,0
	F	0,117 0,203	0,117 0,406	0,117 0,812	0,117 1,62	0,117 3,25	0,117 6,50	0,117 13,0
	G	0,059 0,203	0,059 0,406	0,059 0,812	0,059 1,62	0,059 3,25	0,059 6,50	0,059 13,0

Figura 5: Figuras esquematizando o ensaio checkerboard expressando os valores de concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de canela e conservante ácido acético frente às bactérias *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Bacillus cereus* (c) e *Salmonella typhi* (d). A região em vermelho evidencia a CIM da associação e a região acinzentada caracteriza crescimento microbiano visível.

De acordo com os valores apresentados nos esquemas (a), (b) e (c) da Figura 5, a CIM da associação evidencia a ausência de qualquer efeito aditivo, sinérgico ou antagônico. A concentração inibitória mínima do óleo essencial de canela permaneceu inalterada com a adição de menores concentrações de ácido acético, levando à conclusão de que não houve interferência significativa na potencialidade do conservante ou do óleo. A inibição do

crescimento microbiano é atribuída exclusivamente à CIM do óleo essencial na sua forma isolada. O ICIF a associação foi 1,12 para as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, interpretado como indiferente.

A CIM da associação entre óleo essencial de canela e ácido acético para *Salmonella typhi* expressa na Figura 5 - (d) obteve comportamento diferente das demais, caracterizando-se pela redução da CIM do óleo essencial sozinho pela metade ($0,470 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para $0,235 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando associado com $0,203 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido acético. O ICIF da associação é de 0,62, sendo a associação interpretada como aditiva.

Os valores de CIM da associação entre óleo essencial de melaleuca e ácido acético contra os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi* estão descritos na Figura 6.

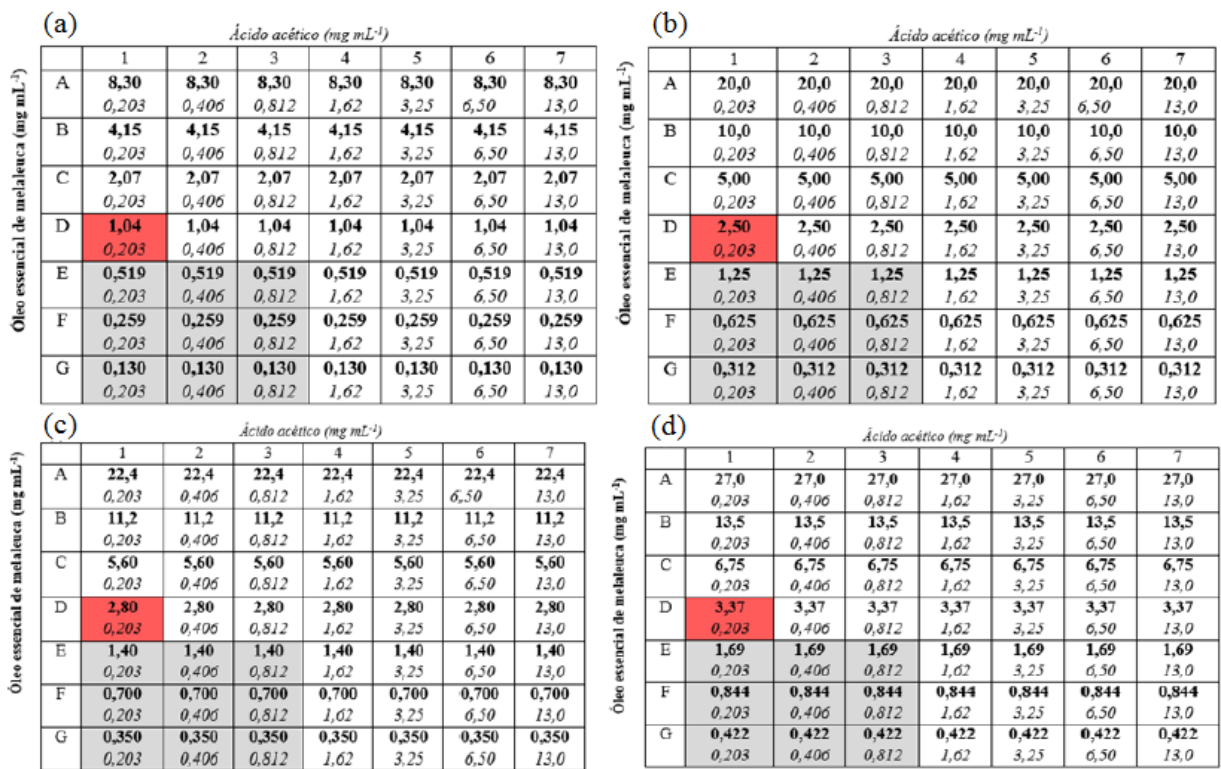


Figura 6: Figuras esquematizando o ensaio checkerboard expressando a concentração inibitória mínima fracionada do óleo essencial de melaleuca e conservante ácido acético frente às bactérias *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b), *Bacillus cereus* (c) e *Salmonella typhi* (d). A região em vermelho evidencia a CIM da associação e a região acinzentada caracteriza crescimento microbiano visível.

O comportamento da associação entre óleo essencial de melaleuca e ácido acético frente às quatro bactéria testadas, *Escherichia coli* (Figura 6a), *Staphylococcus aureus* (Figura

6b), *Bacillus cereus* (Figura 6c) e *Salmonella typhi* (Figura 6d) se manteve semelhante ao comportamento da associação entre este mesmo conservante e óleo essencial de canela, exceto para *S. typhi*. O ICIF é 1,12 para todos os testes, evidenciando a indiferença na associação, uma vez que não houve redução na CIM do óleo essencial quando associado a concentrações menores do que a CIM do ácido acético sem combinação. Portanto, a inibição do crescimento microbiano foi proporcionada inteiramente pelo óleo essencial de melaleuca.

O isoblograma apresentado na Figura 7 representa graficamente o resultado da associação entre o óleo essencial de canela com ácido acético contra *Bacillus cereus*. A curva apresentada no gráfico tem o mesmo comportamento para todos os testes apresentados anteriormente, devido a semelhança nos resultados.

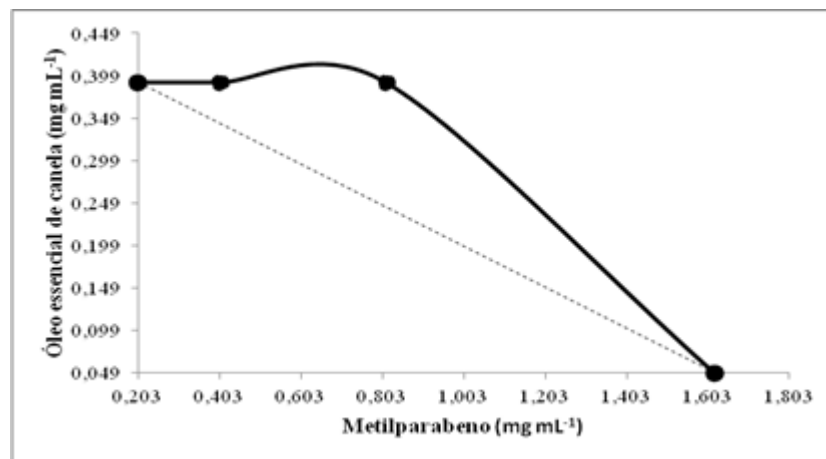


Figura 7: Isoblograma representando a relação entre óleo essencial de canela e ácido acético para *Bacillus cereus*. A linha pontilhada indica atividade aditiva teórica.

Um dos mecanismos descritos para a ação bactericida do ácido acético leva em consideração a composição da parede celular bacteriana, que tem como principal componente estrutural o peptídeoglicano e aminoácidos. Contudo, a estrutura da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é diferente. Nas bactérias Gram-positivas, há presença de uma camada polimérica (peptídeoglicano) espessa, sendo esta insolúvel em álcool, mais rígida e resistente à pressão do que as bactérias Gram-negativas, que por sua vez, são formadas por uma camada delgada de peptídeoglicano, mas que contém lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas. Essa diferença estrutural da parede faz com que bactérias Gram-negativas sejam mais suscetíveis à degradação pela ação do ácido acético do que as Gram-positivas (UTYAMA et al., 2007).

Contudo, os valores indicam que independente da estrutura da parede celular, a concentração que inibiu o crescimento bacteriano foi a mesma tanto para as bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) quanto para as Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) em todos os casos. E em todas associações entre os óleos essenciais de canela e melaleuca com ácido acético, exceto para *Salmonella typhi* com óleo essencial de canela, não houve eficácia no potencial bactericida em concentrações abaixo da CIM do ácido acético isolado. Este fato sugere que o comprometimento do desenvolvimento celular bacteriano tenha se dado através da redução do pH, tendo em vista que as bactérias utilizadas neste trabalho são sensíveis a pH baixo. As diluições e adição do óleo possivelmente comprometeu o abaixamento do pH. O decréscimo na CIM do óleo essencial de canela quando testado frente à *Salmonella typhi* pode ser justificado pela interação óleo-ácido, que atuaram em conjunto facilitando a entrada dos mesmos no interior da célula, por ser uma bactéria Gram-negativa, mais suscetível à degradação por estes compostos (ESTRELA et al., 1994).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o óleo essencial de tangerina não apresentou potencial bacteriostático ou bactericida, sendo ineficiente para o controle do desenvolvimento microbiano. Os óleos essenciais de gengibre e hortelã apresentaram desempenhos relativamente próximos. O óleo essencial de melaleuca apresentou resultados satisfatórios quando isolado, contudo, não apresentou efeito sinérgico quando testado em conjunto com os conservantes químicos.

O óleo essencial de canela apresentou os melhores resultados, com as menores concentrações inibitórias e presença de sinergismo quando associado ao conservante químico metilparabeno, reduzindo significativamente a concentração eficaz deste conservante.

Desta forma, estudos adicionais com aplicações em alimentos devem ser realizados para verificar a possibilidade da utilização destes óleos essenciais em associação com conservantes químicos, a fim de promover a conservação.

8 REFERÊNCIAS

BARON, E. J.; PETERSON, I. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**, 9.ed., St. Louis: Bailey & Scott's, 1994.

BRASIL. **Decreto nº 99.066 de 08 de Março de 1990**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540** – SVS/MS de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm> acesso em: 13 Jan. 2014

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 5**, de 15 de janeiro de 2007.

BRITO, E. Conservantes. **Food Ingredients Brasil**, p.28-51, 2011.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.50–62, 2006.

CARSON, F. C.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.1914-1920, 2002.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Be Food Safe: Protect Yourself from Food Poisoning. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/features/befoodsafe/>>. Acesso em: 12 dez 2013.

CHAO, S.C.; YOUNG, D.G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oils Research**, v.12, p.630-649, 2000.

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

DERWICH, E. RACHIDA, C.; RACHID, T.; SENHAJI, O. In-vitro Antioxidant Activity and GC/MS Studies on the Leaves of *Mentha piperita* (Lamiaceae) from Morocco, **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v.3, p.130-136, 2011.

DERWICH, E.; BENZIANE, Z.; BOUKIR, A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, p.3818-3824, 2009.

DONADIO, L. C.; STUCHI, E. S.; CYRILLO, F. L. L. **Tangerinas ou mandarinas**. Jaboticabal: Funep, 1998.

DOWNS, J. S.; LOEWENSTEIN, G.; WISDOM, J. Strategies for Promoting Healthier Food Choices. **American Economic Review**, v.99, p.159-64, 2009.

DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.12, p.4863-4870, 2007.

ESTRELA, C.; SYDNEY, G. B.; BAMMANN, L. L.; FELIPPE J. O. Estudo do efeito biológico do pH na atividade de enzimática de bactérias. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v.2, 1994.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotec**, v.35, p.1039-1042, 2011.

FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G.; SOUSA, M. R.; SILVA, G. R.; CIANCIULLI, M. E.; CORRÊA, M. F.; FERRARINI, M. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. **Química Nova**, v.36, n.6, 2013.

FICHI, G.; FLAMINI, G.; ZARALLI, R. J.; PERRUCCI, S. Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. **Phytomedicine**, v.14, p.227-231, 2007.

FITZPATRICK, M. **Antimicrobial action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on five common bacteria.** April Fong, 2010. Disponível em: <<https://www.pcc.edu/library/sites/default/files/antimicrobial-effect-tea-tree-oil.pdf>> Acesso em: outubro de 2014.

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

FREESE, E.; SHEU, C. W.; GALLIEERS, E. Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. **Nature**, v.241, p.241-325, 1973.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L.; SARMENTO, C. M. P.; Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresentado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados à Vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.15, n.1, 2013.

GEORGE, S. M.; METRIS, A.; STRINGER, S. C. Physiological state of single cells of *Listeria innocua* in organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 204-210, 2008.

GILES, M.; ZHAO, J.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, v.119, n.2, p.731-737, 2010.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.91-97, 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.853-860, 2003.

HANDA, O.; KOKURA S.; ADACHI, S.; TAKAGI, T.; NAITO, Y.; TANIGAWA, T.; YOSHIDA, N.; YOSHIKAWA, T.; Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. **Toxicology**, v.227, p. 62-72, 2006.

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy**, v.12, p.179-186, 2003.

HART, P. H.; BRAND, C.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; PRAGER, R. H.; JONES, F. J. J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil),

suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v.49, p.619-626, 2000.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **BRASIL ALIMENTOS** – n.9, 2001.

HUYS, G. **Standard Operating Procedure**: Antibiotic susceptibility testing of aquaculture associated bacteria with the disc diffusion method, Laboratory of Microbiology, Universiteit Gent. Belgium, 2002.

IŞCAN, G.; KIRIMER, N.; KÜRKCÜOĞLU, M.; BAŞER, K. H.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of mentha piperita essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3943–3946, 2002.

JANES, M. E.; NANNAPANENI, R.; JOHNSON, M. G. Identification and characterization of two bacteriocin producing bacteria isolated from garlic and ginger root. **Journal of Food Protection**, v.62. p.899–904, 1999.

JEYAKUMAR, E.; LAWRENCE, R.; PAL, T. Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (*Mentha piperita*) oil with standards antibiotics against selected bacterial pathogens. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, n.2, p253-257, 2011.

JOHNSON, O. O.; AYOOLA, G. A.; ADENIPEKUN, T. Antimicrobial activity and the chemical composition of the volatile oil blend from *Allium sativum* (garlic clove) and *Citrus reticulata* (tangerine fruit). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v.5, n.4, p.187-193, 2013.

JOS, H. J.; VELD, H. I. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, n.1, p.1-18, 1996.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 797-803, 2005.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE1, P. J.; NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 2001.

LEWIS, R. E.; DICKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Estest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.345-351, 2002.

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

LIMA, M. P.; ZOGHBI M. G. B.; ANDRADE E. H. A.; SILVA T. M. D.; FERNANDES C. S. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v.35, p.363-366, 2005.

LORENZETTI, E. R.; MONTEIRO, F. P.; SOUZA, P. E.; SOUZA, R. J.; SCALICE, H. K.; DIOGO, J. R.; PIRES, M. S. O. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, p.619-627, 2011.

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

MARQUES, F. P. P.; SPINOSA, W.; FERNANDES, K. F.; CASTRO, C. F. S.; CALIARI, M. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 119-126, 2010.

MATAN, N.; MATAN, N. Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.62, n.1, p.75-78, 2008.

MAZZETO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v.32, n.3, p.732-741, 2009.

MEDICE, R.; ALVEZ, E.; ASSIS, E. R.; MAGNO, R. G.; LOPE, E. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência e agrotecnologia**, v.31, n.1, p.83-90, 2007.

MEYSMAN, P.; RODRIGUEZ, A. S.; FUL, Q.; MARCHALL, K.; ENGELEN, K. Expression divergence between *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reflects their lifestyles. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.6, p.1302-1314, 2013.

MOGHTADER, M. In vitro antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. **African Journal of Plant Science**, v.7, p.521-527, 2013.

MOGHTADER, M.; FARAHMAND, A. Evaluation of the antibacterial effects of essential oil from the leaves of *Laurus nobilis* L. in Kerman Province. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v.5, p.13-17, 2013.

ORNELLAS, C. B. D.; GONÇALVES, M. P. J.; SILVA, P. R.; MARTINS, R. T. Atitude do consumidor frente à irradiação de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 211-213, 2006.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria. **Food Control**, v.18, n. 5, p. 535-540, 2007.

PINTO, J.; NEVES, R. **Análise de riscos no processamento alimentar**. Publindústria, Edições Técnicas, Porto, 2010.

PRATT, D. E. **Natural antioxidants from plant materials**. M.T. Huang, C.T. Ho, C.Y. Lee (Eds.), Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health, American Chemical Society, New York, 1992.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Botucatu. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de São Paulo, 2012.

RAY, B.; BHUNIA, A. **Fundamental Food Microbiology**. Fourth Edition. Taylor & Francis; Boca Raton, USA, 2008.

RAVIDRAN, P. N.; BABLU, K. N.; SHYLAJA, M. **Cinnamon and Cassia: medical and aromatic plants**. Industrial Profiles. CRC Press, 2004.

ROSATO, A.; VITALI, C.; LAURENTIS, N.; ARMENISE, D.; MILILLO, M. A.; Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, v.14, p.727–732, 2007.

SABULAL B.; DAN M.; JOHN A. J.; KURUP R.; PRADEEP N. S.; VALSAMMA K. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmoni* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.67, p. 2469–2473, 2006.

SAAD, B.; BARIA, M. F.; SALEHA, M. I.; AHMADB, K.; KHAIRUDDIN, M.; TALIBB, M. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.1073, n.1, p.393-397, 2005.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Lebensm.-Wiss. u.-Technolol.** v.36, p.467-473, 2003.

SARTORATTO, A.; MACHADO A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.35, p. 275-280, 2004.

SEIXAS, P.T.L.; CASTRO, H. C.; SANTOS, G. R.; CARDOSO, D. P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.13, p.513-517, 2011.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v.1, n.6, p.29-44, 1983.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Editora UFRGS, Porto Alegre, 1999.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3295-3302, 2008.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, v.10, 2011.

SIVASOTHY, Y.; CHONG, K. W.; HAMID, A.; ELDEEN, M. I.; SULAIMAN, S. F.; AWANG, K. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. **Food Chemistry**, v.124, p.514-517, 2011.

SOUZA, E.L. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Recife, 143p. Tese (dotourado), Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* Isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, 2006.

THOMSEN, N. A.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V.; BELKUM, A. V.; CARSON, C. F. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus spp.* to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.41, Issue 4, p.343–351, 2013.

TYAGIA, A. K.; MALIKA, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v.22, n.11, p.1707–1714, 2011.

UTYAMA, I. K. A.; ANDRADE, D.; WATANABE, E.; PIMENTA, F. C.; ITO, I. Y. Determinação da atividade antibacteriana e toxicidade do ácido acético e vinagres branco e tinto. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, p. 202-207, 2007.

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

VIEIRA, T. R.; BARBOSA, C. A. L.; MALTHA, C. R. A.; PAULA, F. V.; NASCIMENTO, E. A. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). **Química Nova**, v.27, n.4, p.536-539, 2004.

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

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES, A. J. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylooccus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p.828-833, 2009.