

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

ANDERSON VALDINEY GOMES RAMOS

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS  
NATURAIS E SEUS EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM  
CONSERVANTES SINTÉTICOS DE ALIMENTOS E COSMÉTICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO  
2015

ANDERSON VALDINEY GOMES RAMOS

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS  
NATURAIS E SEUS EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM  
CONSERVANTES SINTÉTICOS DE ALIMENTOS E COSMÉTICOS**

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

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

TOLEDO  
2015

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

**ANDERSON VALDINEY GOMES RAMOS**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS  
E SEUS EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM CONSERVANTES SINTÉTICOS DE  
ALIMENTOS E COSMÉTICOS**

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 Tiunan  
(Orientadora – UTFPR)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Solange Maria Cottica  
(UTFPR – Toledo)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Juliana Bernardi Wenzel  
(UNIPAR – Toledo)

Toledo, Maio de 2015

---

<sup>1</sup> A folha de aprovação assinada encontra-se na coordenação do curso

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me dado forças e saúde para a realização deste trabalho.

Aos meus pais Valdemir Aparecido Ramos e Sonia Gomes Ramos, e meu irmão Adwagner Ramos pelo incentivo e apoio incondicional em cada momento desta caminhada.

Aos meus avós pelo apoio e orações nos momentos de dificuldades.

À minha orientadora Tatiana Shioji Tiuman pela paciência, disponibilidade e orientação no desenvolvimento desta pesquisa, bem como pelos conhecimentos adquiridos no decorrer do curso.

À todos os professores por compartilhar seus conhecimentos. Em especial aos professores Ricardo Zara, Solange Cottica e Clayton Martin pela ajuda e esclarecimento de dúvidas sempre que foi preciso.

Aos técnicos do laboratório Caroline, Danielle e Rafael pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Aos meus amigos pela motivação e momentos de descontração. Em especial à minha colega Munice Eninger que sempre me auxiliou durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente fizeram parte e contribuíram para a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado.

## RESUMO

RAMOS, Anderson Valdiney Gomes. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de produtos naturais e seus efeitos na associação com conservantes sintéticos de alimentos e cosméticos.** 2015. 76 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2015.

A procura por produtos isentos de conservantes sintéticos tem aumentado a cada dia. Alguns produtos naturais, como os óleos vegetais e essenciais possuem em sua composição substâncias que atuam como agentes na prevenção da oxidação, estabilização de radicais livres e na inibição de micro-organismos, evidenciando um grande potencial para uso como conservante. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antioxidante e antimicrobiana de produtos naturais e verificar um possível efeito sinérgico contra micro-organismos patogênicos quando testados em associação com conservantes sintéticos de alimentos e cosméticos. Foram avaliados óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), lavanda (*Lavandula angustifolia*) e louro (*Laurus nobilis*), e também o óleo vegetal extraído de sementes de romã. Os conservantes sintéticos utilizados foram metilparabeno e metabissulfito de sódio. A atividade antioxidante dos óleos foi determinada através do método de DPPH. A atividade antimicrobiana foi determinada pelas técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), além de testes de associação do óleo com conservante sintético através da técnica de “checkerboard” frente as bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Dentre os óleos avaliados, o óleo essencial de cravo apresentou a maior atividade antioxidante ( $IC_{50}$ :  $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) considerado um antioxidante de ação muito forte, seguido pelos óleos de louro ( $IC_{50}$ :  $0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), citronela ( $IC_{50}$ :  $0,99 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e óleo vegetal de sementes de romã ( $IC_{50}$ :  $2,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), com ação antioxidante fraca. Na determinação da atividade antimicrobiana, os óleos de lavanda e louro apresentaram resultados equivalentes, ambos com CIM de  $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Os óleos essenciais de citronela e cravo apresentaram as menores concentrações inibitórias ( $1,25$  e  $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) para quase todas as cepas testadas, os quais foram associados aos conservantes sintéticos. A presença de sinergismo foi observada somente na combinação do óleo essencial de cravo e metilparabeno frente às bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*, reduzindo a CIM do conservante na presença de baixas concentrações do óleo essencial. Desta forma, conclui-se que o óleo essencial de cravo consiste em um produto natural com excelentes propriedades para uma possível conservação como condimento alimentício ou em cosméticos.

**Palavras-chave:** Concentração Inibitória Mínima. Conservação. DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Óleos essenciais. Óleo vegetal.

## ABSTRACT

RAMOS, Anderson Valdney Gomes. **Antioxidant and antimicrobial activity of natural products and their effects on the association with synthetic food and cosmetic preservatives.** 2015. 76 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, 2015.

The demand for products free of synthetic preservatives it has increased every day. Some natural products such as vegetable and essential oils have in their composition substances that act as agents in the prevention of oxidation, stabilization of free radicals and for inhibiting micro-organisms, indicating a great conservation potential. This study aimed to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of natural products and check a possible synergistic effect against pathogenic micro-organisms when tested in combination with synthetic food and cosmetic preservatives. Were evaluated essential oils citronella (*Cymbopogon nardus*), clove (*Syzygium aromaticum*), eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and laurel (*Laurus nobilis*), and also the vegetable extracted from pomegranate seed oil. The synthetic preservatives utilized were methylparaben and sodium metabisulfite. The antioxidant activity of the oil was determined by DPPH method. The antimicrobial activity was determined by Minimum Inhibitory Concentration techniques (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC), and oil association tests with synthetic preservative through the technique of "checkerboard" front Gram-positive bacteria, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. Among the analyzed oils, essential oil of cloves had the highest antioxidant activity ( $IC_{50}$ :  $0,008 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) considered a very strong antioxidant action, followed by laurel oils ( $IC_{50}$ :  $0,24 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), citronella ( $IC_{50}$ :  $0,99 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) vegetable oil and pomegranate seed ( $IC_{50}$ :  $2.32 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) with a weak antioxidant activity. In the determination of antimicrobial activity, lavender and laurel oils showed similar results, both with MIC  $5.0 \text{ mg.mL}^{-1}$ . The essential oils of citronella and clove showed the lowest inhibitory concentrations ( $1.25$  and  $2.5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) for almost all strains tested, which were associated with the synthetic preservatives. The presence of synergism was observed only in the combination of the essential oil of clove and methylparaben on the bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*, reducing the MIC of the preservative in the presence of low concentrations of the essential oil. Thus, it is concluded that the clove essential oil consists of a natural product with excellent properties for possible conservation as a food condiment or cosmetics.

**Keywords:** Minimal Inhibitory Concentration. Conservation. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Essential oils. Vegetable oil.

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

$\mu\text{L}$	microlitro;
$\text{mg.mL}^{-1}$	miligrama por mililitro;
$\text{mol.L}^{-1}$	mol por litro;
$\mu\text{g.mL}^{-1}$	micrograma por mililitro;
$\mu\text{M}$	micromolar;
$\mu\text{mol}$	micromol;
nm	nanômetro;
$\text{UFC.mL}^{-1}$	Unidade formadora de colônias por mililitro;
DMSO	Dimetilsulfóxido;
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila;
AOAC	Official Methods of Analysis;
CIM	Concentração Inibitória Mínima;
CBM	Concentração Bactericida Mínima;
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute;
AAI	Índice de atividade antioxidante;
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalente Trolox;
ATCC	American Type Culture Collection;
$\text{IC}_{50}$	Concentração inibitória de 50 %;
UV/VIS	Ultravioleta visível.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química do ácido punícico (a) e ácido $\alpha$ -linolênico (b).....	15
FIGURA 2 - Estruturas químicas dos compostos citronelal (a) citronelol (b) e geraniol (c)...	16
FIGURA 3 - Estrutura química do eugenol.....	17
FIGURA 4 - Estrutura química do 1,8-cineol .....	18
FIGURA 5 - Estrutura química do acetato de linalila (a) e linalol (b).....	18
FIGURA 6 - Exemplo de reação entre o radical livre DPPH e um produto antioxidante (R-H).....	21
FIGURA 7 - Ilustração da romãzeira (A), fruta (romã) (B), sementes com arilo (C) e sementes secas sem arilo (D).....	30
FIGURA 8 - Curva padrão de DPPH .....	40
FIGURA 9 - Exemplo de curva utilizada para a determinação da equação da reta para os óleos.....	40
FIGURA 10 - Curva padrão de Trolox.....	40
FIGURA 11- Isobogramas obtidos através da associação entre o óleo essencial de cravo e o conservante sintético metilparabeno.....	50
FIGURA 12- Isobogramas obtidos através da associação entre o óleo essencial de citronelela e o conservante sintético metilparabeno.....	51
FIGURA 13- Isobogramas obtidos através da associação entre o óleo essencial de cravo e o conservante sintético metabissulfito de sódio.....	53

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Informações sobre o nome científico, parte da planta utilizada e principais constituintes da composição química dos óleos essenciais .....	38
TABELA 2 – Valores de IC <sub>50</sub> , Índice de Atividade Anioxidante (AAI) e Capacidade Antioxidante em Equivalente Trolox (TEAC) obtidos para cada óleo na determinação do potencial antioxidante pelo método de DPPH ..	42
TABELA 3 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os óleos testados contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.....	45
TABELA 4 – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os conservantes sintéticos contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas .....	48
TABELA 5 – Valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) das combinações de óleo com os conservantes sintéticos contra bactérias patogênica e seus respectivos desvios padrões (DP).....	50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 OBJETIVOS .....</b>	<b>11</b>
1.1.1 Objetivo Geral .....	11
1.1.2 Objetivos Específicos .....	11
<b>1.1 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO CONSERVANTE .....	13
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E VEGETAIS .....	13
2.2.1 Óleo vegetal de semente de romã .....	14
2.2.2 Óleo essencial de citronela .....	15
2.2.3 Óleo essencial de cravo folhas.....	16
2.2.4 Óleo essencial de eucalipto.....	17
2.2.5 Óleo essencial de lavanda.....	18
2.2.6 Óleo essencial de louro.....	19
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS NATURAIS .....	19
2.4.1 Micro-organismos.....	22
2.5 CONSERVANTES SINTÉTICOS .....	23
2.5.1 Metilparabeno.....	24
2.5.2 Metabissulfito de sódio.....	25
2.6 ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 MATERIAL .....	27
3.1.1 Obtenção das amostras .....	27
3.1.2 Micro-organismos.....	28
3.1.3 Conservantes sintéticos.....	28
3.1.4 Reagentes e meios de cultura.....	29
3.2 MÉTODOS .....	29
3.2.1 Preparo das amostras de romã .....	29
3.2.2 Determinação da umidade da amostra de sementes de romã .....	30
3.2.3 Extração do óleo das sementes de romã .....	31
3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	32
3.3.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos pelo método de DPPH.....	32

3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	34
3.4.1 Preparo das soluções de óleo e conservantes sintéticos .....	34
3.4.2 Preparo do inóculo bacteriano .....	34
3.4.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos e conservantes sintéticos .....	35
3.4.4 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os óleos e conservantes sintéticos .....	36
3.4.5 Teste de associação dos óleos com conservantes sintéticos pela técnica de “checkerboard” .....	37
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1 Obtenção do óleo vegetal de sementes de romã.....	39
4.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH.....	39
4.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos óleos e conservantes sintéticos pelas técnicas de CIM e CBM.....	45
4.4 Associação dos óleos com conservantes sintéticos pela técnica de “checkerboard” .....	49
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
ANEXO A – Cromatograma do óleo essencial de citronela ( <i>Cymbopogon nardus</i> ). .....	67
ANEXO B – Cromatograma do óleo essencial de cravo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....	67
ANEXO C – Cromatograma do óleo essencial de eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> ) .....	68
ANEXO D – Cromatograma do óleo essencial de lavanda ( <i>Lavandula angustifolia</i> ).....	68
ANEXO E – Cromatograma do óleo essencial de louro ( <i>Laurus nobilis</i> ). .....	69
APÊNDICE A – Quadros representando o teste de “checkerboard” para as associações do óleo e conservante sintético .....	70

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais pelo homem é praticada há muito tempo, por exercerem uma influência benéfica sobre a saúde humana. Seu principal uso se dava para fins nutricionais e terapêutico, pela utilização de frutos, plantas, cereais e até micro-organismos (COUTINHO et al., 2004).

Com o acelerado desenvolvimento de novas tecnologias de conservação, os produtos naturais vêm sendo substituídos por aqueles sintetizados quimicamente, que tem por função evitar a contaminação microbiana e prolongar o tempo de vida útil de vários produtos dos setores alimentício, farmacêutico, cosmético, entre outros (PACKER; LUZ, 2007; RODRIGUES, 2010). No entanto, como consequência, trazem alguns danos à saúde quando consumidos com frequência, tais como alergias, rinite e possível aparecimento de câncer (HONORATO et al., 2013). Com isso, se faz importante a procura por produtos menos prejudiciais à saúde, de qualidade e que sejam de origem natural. Dentro dessa perspectiva, o uso de antimicrobianos e antioxidantes naturais se faz cada vez mais necessário nas práticas de conservação de produtos (MARTIN, 2011).

Inúmeras pesquisas sobre atividade antimicrobiana e antioxidante de produtos naturais têm sido intensificadas até hoje (BURT, 2004; JARDINI; MANCINI FILHO, 2007; MARTIN, 2011). Os óleos essenciais, constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de diversas plantas, são compostos naturais que vêm despertando grande interesse nessas pesquisas, por apresentarem em sua composição substâncias, como compostos fenólicos, terpenos e terpenoides, potencialmente úteis no controle de agentes oxidantes, radicais e micro-organismos prejudiciais veiculados por cosméticos e alimentos (SOUZA et al., 2011; PROBST, 2012).

Outro produto natural em destaque são os óleos vegetais, geralmente extraído de sementes de frutos e vegetais, apresentam em sua composição diversos compostos, como os ácidos graxos que atuam como substâncias antioxidantes e antimicrobianas, além de proporcionarem efeitos benéficos à saúde (CORRÊA et al., 2013). Estudos realizados com o óleo extraído de sementes de romã (*Punica granatum* L.), demonstram tais propriedades, por apresentar em sua composição como principal ácido graxo, o ácido punícico, considerado um forte antioxidante e com potencial antimicrobiano (MELO, 2012b).

Desta forma, é cada vez maior a necessidade de testes laboratoriais, que avaliem o potencial antimicrobiano desses agentes naturais, que podem ser utilizados isolados ou em

combinação para fins terapêuticos ou conservante, de forma que comprovem o efeito e qualidade do produto. A combinação de agentes antimicrobianos pode ser utilizada para aumentar o espectro de ação dos agentes promovendo uma ação benéfica, ou seja um efeito sinérgico ou resultar em um potencial negativo (efeito antagônico) ao produto testado (BARBOSA, 2011; NOGUEIRA, 2012).

Contudo, a escolha correta do antimicrobiano natural é essencial, estando baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o produto a ser testado, para ser um potente conservante contra micro-organismos patogênicos, e que não traga risco de intoxicações e complicações na saúde do consumidor (SETTANNI<sup>2</sup>; CORSETTI, 2008 apud MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de produtos naturais, e verificar um possível efeito sinérgico quando testados em associação com conservantes sintéticos de alimentos e cosméticos, contra micro-organismos patogênicos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração do óleo vegetal de sementes de romã e determinar seu rendimento;
- Avaliar o potencial antioxidante do óleo vegetal de romã e óleos essenciais adquiridos comercialmente, utilizando a técnica de DPPH;
- Determinar a atividade antimicrobiana dos óleos por meio da técnica de concentração inibitória mínima (CIM), e concentração bactericida mínima (CBM), sobre cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas;

---

<sup>2</sup>SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.

- Determinar a atividade antimicrobiana dos conservantes sintéticos metilparabeno e metabissulfito de sódio por meio da técnica de concentração inibitória mínima (CIM), e concentração bactericida mínima (CBM) sobre cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;
- Avaliar o efeito sinérgico dos óleos que apresentarem maior potencial antimicrobiano, com conservantes sintéticos de alimentos e cosméticos, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

As indústrias químicas e farmacêuticas vêm produzindo continuamente uma variedade de diferentes antibióticos e conservantes, pois cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência de alguns micro-organismos frente alguns produtos, como alimentos, medicamentos e cosméticos (COUTINHO et al.; 2004).

Os conservantes sintéticos exercem a função de impedir ou retardar a ação deteriorante de micro-organismos, agentes físicos ou enzimas em alimentos, além de contribuírem para aumentar a vida útil do produto (RODRIGUES, 2010). Atualmente, novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para substituir os conservantes sintéticos utilizados em produtos, por substâncias naturais que apresentam ação conservante. Isso se deve por esses aditivos sintéticos, mesmo considerados seguros em baixas concentrações, serem prejudiciais para as propriedades organolépticas do produto, como também, para a saúde do consumidor, se consumidos com frequência.

Alguns produtos naturais se destacam por apresentarem em sua composição química, substâncias com alta atividade antioxidante e antimicrobiana, que podem ser empregados como conservantes naturais, no combate de radicais livres e de micro-organismos indesejáveis, como os óleos essenciais e vegetais, extraídos de partes de plantas e frutos.

Desta forma, pesquisas voltadas para o estudo e avaliação de produtos naturais com propriedades antimicrobianas e antioxidantes devem ser estimuladas, de forma que estas substâncias associadas aos conservantes sintéticos proporcionem uma redução na concentração do conservante, sem alterar sua eficiência. O impacto da redução desses conservantes sintéticos resultaria em um produto menos tóxico e também menos prejudicial para o organismo humano.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS COM AÇÃO CONSERVANTE

Cresce cada vez mais diante aos consumidores, a busca por produtos naturais, pois é uma fonte de saúde e bem-estar, em relação aos produtos industrializados (MARTIN, 2011).

Os conservantes são substâncias naturais ou sintéticas que atuam na conservação de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, entre outros, a fim de, manter os produtos aptos para consumo. Esses produtos exercem a função de impedir ou minimizar algumas alterações causadas pela ação de micro-organismos ou agentes físicos, aumentando a vida útil do produto (RODRIGUES, 2010).

Alguns produtos são destacados por apresentarem atividade antimicrobiana em seu estado natural, por possuírem em sua composição determinados compostos que atuam como agentes conservantes. (SOUZA et al., 2012a).

As substâncias de natureza vegetal, como óleos essenciais e extratos, apresentam um potencial relevante como conservante, atuando na inibição de micro-organismos. Desta forma, diversas pesquisas são voltadas para esses compostos, que se apresentavam apenas como vetores de aroma, gostos, ação terapêutica, e que atualmente podem ser empregados na conservação de produtos (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

O potencial de aplicação desses compostos de origem vegetal ou mineral no mercado de cosméticos e alimentos está cada vez maior, devido à alta procura por produtos que sejam seguros e que não tragam riscos, como alergias e intoxicações. Assim, a substituição de conservantes sintéticos por conservantes naturais vem de encontro com essa perspectiva (MARTIN, 2011; OSTROSKY, 2008).

### 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E VEGETAIS

Os óleos vegetais são constituídos principalmente de triglicerídeos (95-98%, extraídos geralmente de sementes de plantas e frutos, e uma mistura de componentes menores (2-5%) como outros compostos químicos. Os componentes menores apresentam uma ampla

composição qualitativa e quantitativa, dependendo da espécie vegetal de que foram obtidos (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

Os óleos extraídos de sementes de frutos têm um importante papel funcional e sensorial nos produtos alimentares, devido à rica presença de ácidos graxos em sua composição e às suas vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (SOUZA, 2012b). Contudo, em uma mesma espécie o conteúdo e a composição podem variar devido às condições climáticas e agronômicas, qualidade da matéria-prima, método de extração e procedimentos de refino (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

Os óleos essenciais (OE) são produtos aromáticos provenientes do metabolismo secundário de plantas, geralmente presente nas folhas, cascas, talos ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. Apresentam uma larga aplicação como aromatizante em alimentos e cosméticos, como também nas indústrias de conservantes (RIBEIRO, 2011).

Esses óleos essenciais são caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e aromas. Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, ou com a utilização de solventes orgânicos (TROMBETTA et al., 2005). Dentre as várias substâncias presentes em sua composição, os terpenos e terpenoides apresentam-se em maior quantidade, além de alcoóis, aldeídos, ésteres, entre outros. Esses compostos são conhecidos por serem ativos contra uma grande variedade de microorganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, as Gram-negativas e fungos (PROBST, 2012; TROMBETTA et al., 2005).

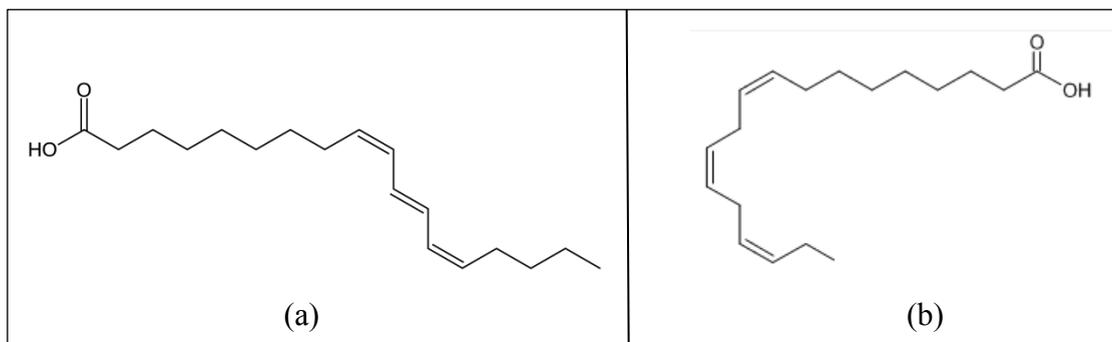
### 2.2.1 Óleo vegetal de semente de romã

A romã (*Punica granatum* L.) é um fruto originário do Oriente Médio. Sua árvore, a romãzeira se adapta a climas tropicais e subtropicais. Sua produção se dá no período de setembro a fevereiro, e é considerado um fruto com uma longa história medicinal, amplamente utilizado por muitos povos, principalmente os orientais por ser conhecida principalmente por suas propriedades antibacterianas e antiinflamatórias (SANTOS et al., 2010).

O fruto apresenta um formato esférico, com casca amarela ou avermelhada, manchada de escuro contendo em seu interior sementes, revestidas por um arilo de cor rósea, de sabor doce, ligeiramente ácido (BARBOSA, 2010).

O fruto é também caracterizado por sua ação antioxidante, determinada pelos compostos fenólicos presentes em sua composição. Entre os principais compostos fenólicos presentes em sua parte interna, encontram-se as antocianinas, flavonóides (quercetina, rutina), taninos e também ácidos fenólicos, como os ácidos gálico, puníco e elágico (JARDINI, 2005).

O ácido puníco ( $C_{18}H_{30}O_2$ ) que se encontra em uma maior quantidade no óleo vegetal de sementes de romã, é um ácido graxo conjugado, que apresenta insaturações nas posições 9-cis, 11-trans, 13-cis, é também o isômero posicional do ácido  $\alpha$ -linolênico (9-cis, 12-cis, 15-cis), cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 1. Além disso, é considerado um ácido graxo que traz benefícios para a saúde, como na redução de triglicerídeos hepáticos e na prevenção contra células cancerígenas (MELO, 2012a). Desta forma, é alvo de várias pesquisas e análises que testam seu potencial (LANSKY; NEWMAN, 2006; MELO, 2012a).



**Figura 1- Estrutura química do ácido puníco (a) e ácido  $\alpha$ -linolênico (b)**  
**Fonte: Melo et al. (2014).**

### 2.2.2 Óleo essencial de citronela

A citronela (*Cymbopogon nardus* L.) é uma planta aromática pertencente a família Poaceae, originária do Ceilão e sul da Índia. Essa planta é conhecida por ser retirado de suas folhas um óleo com propriedades repelentes de insetos do lar e de grãos armazenados, tendo grande aplicação na indústria de cosméticos e perfumaria (CASTRO; RAMOS, 2003).

O óleo de citronela apresenta diversas substâncias em sua composição, tendo como constituintes principais: citronelal ( $C_{10}H_{18}O$ ), citronelol ( $C_{10}H_{20}O$ ) e geraniol ( $C_{10}H_{18}O$ ) (COSTA et al., 2008). Segundo Bordoloi (1982), os óleos desta espécie cultivados em diferentes regiões da Índia apresentam variações no rendimento dos principais constituintes, sendo citronelal (34,0 a 57,4%), geraniol (14,6 a 29,0%) e citronelol (10,0 a 18,8%) aproximadamente (Figura 2). O citronelol é caracterizado como um excelente aromatizante e na ação contra insetos, além de apresentar ação antimicrobiana frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MATTOS et al., 2000).

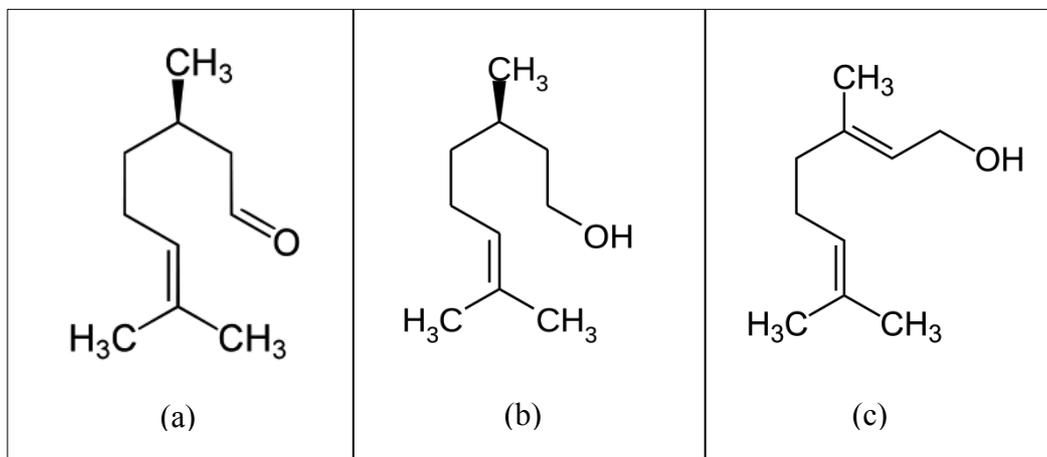


Figura 2- Estruturas químicas dos compostos citronelal (a), citronelol (b) e geraniol (c)

### 2.2.3 Óleo essencial de cravo folhas

O cravo (*Syzygium aromaticum* L.), popularmente conhecido como cravo-da-Índia, é uma planta pertencente à família Myrtaceae, originária da Índia, encontrada e cultivada em diversos países tropicais, inclusive no Brasil (COSTA et al., 2011).

As partes que compõe o cravo-da-índia (folhas, botões), como também seu óleo essencial, apresentam várias aplicações, como condimento para alimentos, medicamentos e também na formulação de perfumes especiais e incensos aromáticos, conferidos principalmente pelo principal constituinte do óleo, um composto fenólico volátil, o eugenol ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) (RABÊLO, 2010), representado na Figura 3. De acordo com Raina et al. (2001), o óleo extraído das folhas de cravo pode chegar a apresentar até aproximadamente 95% de eugenol em sua composição.

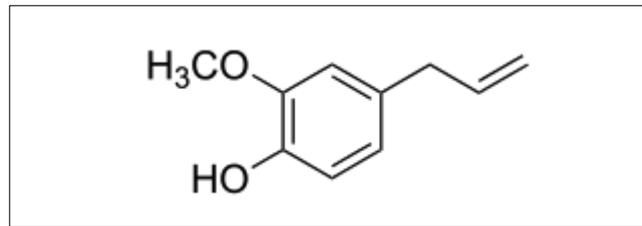


Figura 3- Estrutura química do eugenol

O óleo essencial de cravo, é caracterizado por apresentar potentes características biológicas como capacidade antioxidante, inseticida, fungicida e ação antimicrobiana, devido a presença de eugenol em sua composição (COSTA et al., 2011; BHUIYAN et al., 2010). Em estudo realizado por Scherer et al. (2009) que avaliou as propriedades do óleo essencial de cravo, foi demonstrado que o mesmo apresenta uma forte ação antioxidante e ação moderada a forte frente a bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e sobre Gram negativas (*Salmonella typhi* e *Escherichia coli*), comumente veiculadas por alimentos.

#### 2.2.4 Óleo essencial de eucalipto

O óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) é conhecido por suas várias propriedades medicinais e cosméticas, como sua utilização na formulação de medicamentos e pomadas, como também sua utilização em perfumarias (ROCHA; SANTOS, 2007). O gênero *Eucalyptus* pertence à família Myrtaceae e compreende aproximadamente sete centenas de espécies, quase todas originárias da Austrália e da Tasmânia. Os óleos essenciais de eucalipto são obtidos geralmente por destilação das folhas, como característica principal o aroma da espécie utilizada (FIGUEIREDO et al., 2011; VILELA, 2007).

Outra característica do óleo essencial de eucalipto é sua ação frente a bactérias e fungos. Tyagi e Malik (2011) avaliaram o potencial antimicrobiano deste óleo e observaram variações de concentração inibitória mínima sobre diferentes fungos.

O principal composto encontrado no óleo de eucalipto, é o 1,8-cineol ou eucaliptol ( $C_{10}H_{18}O$ ) representado na Figura 4, apresentando concentração média de 80% presente no óleo (FIGUEIREDO et al., 2011; VITTI; BRITO, 2003).

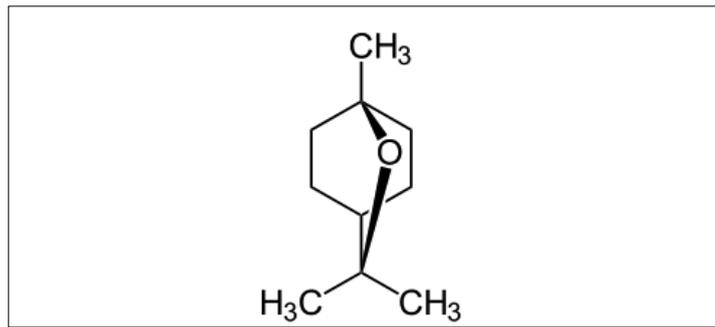


Figura 4- Estrutura química do 1,8-cineol

### 2.2.5 Óleo essencial de lavanda

O óleo das flores de lavanda (*Lavandula angustifolia* M.) é caracterizado pelo seu amplo uso na aromaterapia. As plantas do gênero *Lavandula* são pertencentes à família Lamiaceae, e têm sido utilizadas para uma variedade de aplicações na indústria cosmética e para fins terapêuticos (SILVEIRA et al., 2012). Segundo Cavanagh & Wilkinson (2002), o óleo dessa planta também apresenta características analgésicas, pesticidas e antimicrobianas.

Os principais compostos presentes no óleo essencial de lavanda são o acetato de linalila ( $C_{12}H_{20}O_2$ ) e linalol ( $C_{10}H_{18}O$ ) representados na Figura 4 (VENSKUTONIS et al., 1997).

Silveira et al. (2012), avaliaram a atividade do óleo essencial de lavanda frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas e constataram inibição para alguns microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Alcaligenes fecalis*, entre outros.

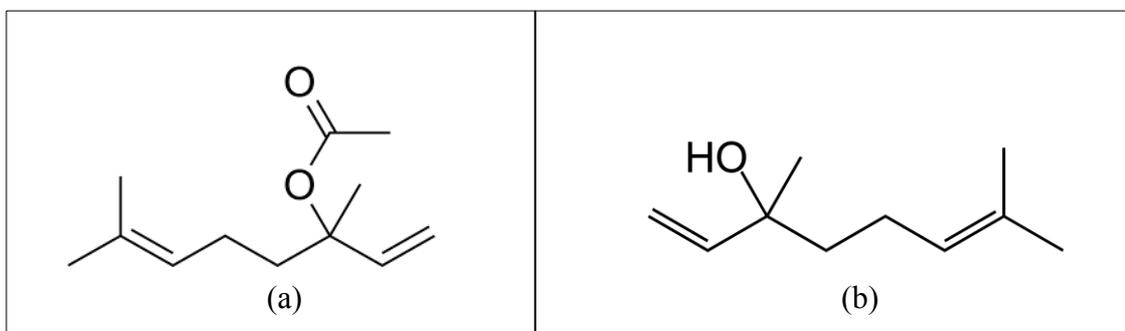


Figura 5- Estrutura química do acetato de linalila (a) e linalol (b)

### 2.2.6 Óleo essencial de louro

O louro (*Laurus nobilis* L.) é uma planta originária da Ásia Menor, pertencente a família Lauraceae. O óleo essencial de folhas de louro é empregado como condimento alimentar, como fonte de óleo essencial na perfumaria, como também na medicina popular, empregado como sudorífico e contra flatulências e, no uso externo, em feridas e úlceras (CORRÊA, 1984; DUARTE; OLIVEIRA, 2006; MARQUES, 2001).

No estudo realizado por Sangun et al. (2007) foi avaliado a composição química do óleo essencial de folhas e frutos de louro (*Laurus nobilis*) por cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massas. O composto 1,8-cineol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) foi o componente majoritário, apresentando aproximadamente 59,94% de sua composição no óleo (Figura 4). Outros compostos como: sabineno,  $\alpha$ -pineno, acetato de terpinila, linalol, entre outros em menores quantidades.

O óleo essencial de louro, também é conhecido por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Estudos realizados com o óleo essencial desta planta, mostram bons resultados de inibição, quando avaliado frente a *Listeria monocitogenes* e *Salmonella enteritidis*, micro-organismos veiculados por alimentos (SIMI et al., 2003; TAJKARIMI et al., 2010).

## 2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRODUTOS NATURAIS

Os antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação de um substrato de maneira eficaz (JARDINI, 2005). Dentre os mecanismos de ação que os antioxidantes apresentam a sua capacidade em reagir com radicais livres é a mais conhecida. Por meio dela, ocorre uma estabilização entre as espécies reativas diminuindo assim, a ação indesejada de radicais livres no organismo (JARDINI, 2005; JARDINI; MANCINI FILHO, 2007).

As substâncias antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetoras e agir em diversas etapas do processo oxidativo, exercendo sua ação por diferentes mecanismos, permitindo classificá-los como primários e secundários. Os compostos capazes de inibir ou retardar o processo oxidativo de radicais livres, pela doação de átomos de

hidrogênio ou de elétrons de forma que os radicais livres são transformados em substâncias estáveis, são considerados antioxidantes primários, como os compostos fenólicos e tocoferóis. Os antioxidantes classificados como secundários, apresentam sua ação no bloqueio e inativação de peróxidos e hidroperóxidos em espécies não radicalares, complexação de metais ou absorção de radiação ultravioleta como as vitaminas A, C e E (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; SILVA et al., 2010).

As condições desejadas em uma substância antioxidante são a capacidade de doar átomos de hidrogênio ou elétrons ao radical, apresentar uma estrutura estável após a reação com o radical livre e apresentar propriedades de quelar metais de transição envolvidos no processo oxidativo (JARDINI, 2005).

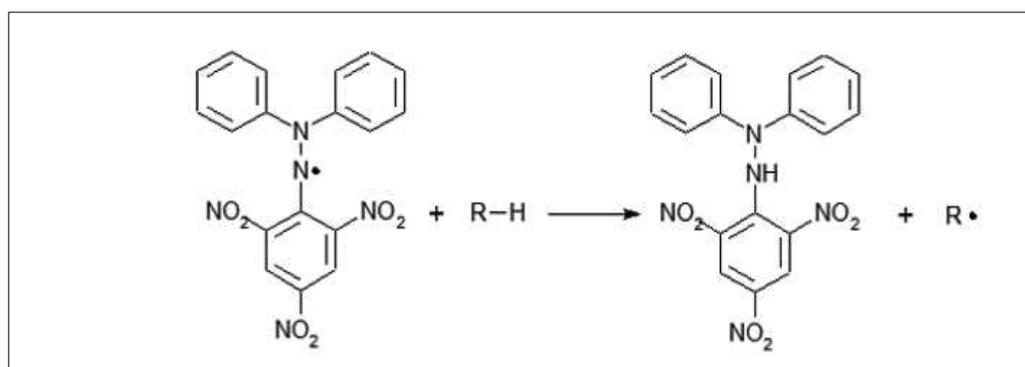
O processo de oxidação lipídica envolve uma variedade de radicais livres, e é causado por influência de temperatura, presença de luz ou oxigênio, além de propriedades físico-químicas do produto em questão. A utilização de antioxidantes sintéticos e naturais nesse processo pode minimizar e obter um controle sob a oxidação lipídica, como já vem sendo indicado por diferentes pesquisas (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007; SANTOS et al., 2010).

Os antioxidantes naturais encontrados em plantas (metabólitos secundários) e frutas estão relacionados com a presença de terpenos, compostos fenólicos e alguns ácidos graxos. As propriedades benéficas que compõe esses alimentos de origem vegetal estão associadas às propriedades antioxidantes e nutritivas destes compostos (OLIVEIRA, 2011; TAYZ; ZEIGER, 2004).

Os terpenos são substâncias que fazem parte da constituição dos óleos essenciais. São formados a partir da condensação de unidades de isopreno (C5), e classificados de acordo com sua estrutura carbônica, podendo se apresentar na forma de monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20) e seus derivados terpenoides, que apresentam o elemento oxigênio presente na estrutura. Os terpenos possuem a mesma origem que os ácidos graxos, porém apresentam ramificações e estruturas cíclicas (BAKKALI et al., 2008; TOSCAN, 2010).

Os compostos fenólicos são denominados como uma classe de substância que possuem um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxílicos incluindo seus grupos funcionais. Entre essa classe de substâncias, que representam sua composição, encontram-se: fenóis simples, flavonóides, ácidos fenólicos e derivados, ligninas, taninos, entre outros (OLIVEIRA, 2011).

Vários são os métodos para determinar a atividade antioxidante de um produto natural ou sintético, podendo ser testados *in vitro* e *in vivo*. Um desses métodos *in vitro*, que é muito utilizado é o método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Esse método colorimétrico baseia-se na redução do radical livre DPPH através da doação de átomos de hidrogênio do antioxidante (R-H) à molécula do radical, resultando em sua estabilização (Figura 6) (ARUOMA et al., 1997; VEDANA, 2008).



**Figura 6-** Exemplo de reação entre o radical livre DPPH e um produto antioxidante (R-H)  
**Fonte:** Adaptado de Kumar et al. (2011).

Para a realização desta análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda próximo à 517 nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce e ocorre a mudança de coloração, inicialmente violeta para o amarelo, frente às moléculas antioxidantes testadas. A mudança pode ser medida por um espectrofotômetro e plotada contra a concentração. Para expressar a atividade antioxidante utiliza-se o IC50, ou seja, a concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação. (DI MAMBRO; MARQUELE; FONSECA, 2005; REZENDE, 2010; VEDANA, 2008). Um valor baixo de IC50 indica que será necessária uma pequena quantidade de óleo essencial para reduzir 50% do radical livre DPPH e consequentemente maior será seu potencial antioxidante (RUFINO et al., 2007a).

## 2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais, extratos, sementes de diversas plantas e frutos tem sido objetivo de várias pesquisas nos últimos anos. Os antimicrobianos naturais ocorrem em plantas como um mecanismo de defesa contra micro-organismos. Tais agentes podem exibir atividade antimicrobiana em alimentos, por exemplo, ocorrendo naturalmente, ou pela utilização como aditivos ou conservantes. O potencial de aplicação desses compostos naturais está cada vez mais em destaque, devido à alta procura dos consumidores por produtos exentos de conservantes sintéticos (MARTIN, 2011).

Alguns antimicrobianos naturais mais estudados, como plantas, frutos, bem como seus óleos essenciais e compostos isolados, apresentam um grande número de substâncias que inibem as ações metabólicas de bactérias, fungos e leveduras. Essas substâncias incluem diversas classes de compostos, tais como saponinas, flavonóides taninos, quinonas, ácidos graxos, terpenos, entre outros (MARTIN, 2011).

O potencial antimicrobiano de produtos naturais pode ser avaliado através da determinação de uma quantidade mínima da substância necessária para inibir o crescimento de micro-organismos, denominado Concentração Inibitória Mínima (CIM). Trata-se de uma técnica bastante utilizada em estudos com produtos naturais, a fim de intensificar os aspectos toxicológicos, microbiológicos e legais, sob os compostos estudados ou suas combinações (OSTROSKY et al., 2008).

### 2.4.1 Micro-organismos

Os micro-organismos ou micróbios são minúsculos seres vivos, caracterizados por apresentar as primeiras características de um sistema de vida na terra. O grupo de micro-organismos é constituído de bactérias, fungos (leveduras e mofos), vírus, protozoários e algas (MADIGAN et al., 2010).

Os micro-organismos possuem muitas aplicações comerciais, como na síntese de produtos químicos, tais como a acetona, ácidos orgânicos e enzimas. Nas indústrias de alimentos, tendo aplicação na produção de vinagre, pickles, bebidas alcóolicas, queijos, iogurtes, entre outros. Como também na indústria farmacêutica e cosmética, no

desenvolvimento de novos medicamentos e produtos. Entretanto, existe uma classe de micro-organismos considerada patogênica, ou seja, causadora de doenças. Desta forma, o conhecimento prático sobre os micróbios é necessário para a medicina e para as ciências relacionadas à saúde (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Alguns micro-organismos patogênicos produzem toxinas que se tornam extremamente prejudiciais a saúde humana. Algumas bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e quase todos os membros do gênero *Salmonella*, são consideradas patogênicas (STAMFORD et al., 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As bactérias são organismos relativamente simples, unicelulares e procariontes cujo material genético não está envolto por uma membrana nuclear especial. Esses micro-organismos são envolvidos por uma parede celular que é praticamente composta por um complexo de carboidrato e proteína denominado peptidoglicana. As bactérias são classificadas em dois grandes grupos como Gram-positivas e Gram-negativas. Uma das diferenças entre esses dois grupos é que as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular com muitas camadas de peptidoglicana, formando uma estrutura rígida. As Gram-negativas consistem de uma ou algumas camadas de peptidoglicana e uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos e lipoproteínas. Devido a essa membrana externa, as bactérias Gram-negativas são consideradas mais resistentes que as positivas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

## 2.5 CONSERVANTES SINTÉTICOS

Os conservantes sintéticos são aditivos utilizados a fim de, manter os produtos aptos para consumo, ou seja, são denominados agentes químicos de conservação. Esses aditivos exercem a função de impedir ou minimizar algumas alterações causadas pela ação de micro-organismos ou agentes físicos, aumentando a vida útil do produto. Dentre tantos conservantes sintéticos, alguns se destacam por apresentarem eficácia e ação inibidora, como os ácidos orgânicos e seus sais, nitrato e nitritos, antibióticos, parabenos, entre outros (RODRIGUES, 2010).

No entanto, por se tratarem de substâncias químicas intencionalmente adicionadas aos alimentos, torna-se fundamental conhecer suas propriedades, de maneira a garantir seu

uso adequado. Apesar de sua ampla utilização, são substâncias capazes de provocar reações adversas no organismo como qualquer outra droga, podendo ser prejudiciais quando consumidos com muita frequência (AUN et al., 2011).

### 2.5.1 Metilparabeno

Dentre os conservantes sintéticos permitidos pela legislação brasileira e mais utilizados em produtos cosméticos, fármacos e alimentos, estão os ésteres do ácido *p*-hidróxibenzóico denominado de parabenos. Esses compostos são amplamente utilizados, devido a baixa reatividade, resistência a hidrólises em aquecimento e resfriamento de água, são incolores, inodoros, não voláteis e são considerados estáveis em uma ampla faixa de pH (CARREIRA, 2008; HANDA et al., 2006).

Os parabenos apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, embora estudos comprovem que apresentam uma maior eficácia contra leveduras e bolores. A atividade desses conservantes contra micro-organismos aumenta com o aumento da cadeia alquílica, mas em contrapartida diminui a solubilidade em meio aquoso (FERREIRA, 2010).

O metilparabeno ( $C_8H_8O_3$ ) apresenta-se como um pó cristalino branco e inodoro. Entre a classe dos parabenos, é o composto que apresenta uma maior solubilidade em água, por apresentar uma cadeia alquílica menor. O metilparabeno é utilizado isolado ou em conjunto com propilparabeno ou com outros agentes conservantes, devido apresentar potencial sinérgico quando associado (SAAD et al., 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece através da RDC nº 5 de 15/01/2007, um valor de  $0,03 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , sendo a concentração máxima permitida do conservante metilparabeno em alimentos.

Segundo a RDC nº 162 de 11/09/2001 (ANVISA), estabelece concentrações máximas de metilparabeno permitidas de 0,4% m/m ( $0,4 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) isolado ou 0,8% m/m ( $0,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) associado a outros conservantes na aplicação em cosméticos.

### 2.5.2 Metabissulfito de sódio

O metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) é um composto inorgânico com características de um pó cristalino de coloração branca. É caracterizado por ser um agente redutor, e por apresentar potencial de atividade antioxidante e antimicrobiana, tais propriedades que resultam em sua ampla utilização como conservante pelo setor alimentício (ALBUQUERQUE, 2005).

Os sulfitos são agentes antimicrobianos com efeito inibitório sobre bactérias e leveduras, sendo que sua ação na proliferação de micro-organismos é dependente de sua forma química, sendo mais evidenciada em valores de pH inferiores a 3,0, devido à maior liberação de dióxido de enxofre molecular ( $\text{SO}_2$ ) (MACHADO<sup>3</sup>, TOLEDO, 2006; apud FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

A ação antimicrobiana do dióxido de enxofre baseia-se na inibição, pelos sulfitos, de reações catalisadas por enzimas, dependendo assim da ação do  $\text{SO}_2$  molecular através da membrana celular do microrganismo. (LUCK<sup>4</sup>; JAGER, 1995; apud FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

A ANVISA é responsável pela regulamentação quanto ao uso desses aditivos alimentares. Através da RDC nº 8, de 06 de março de 2013, estabelece concentrações máximas permitidas de metabissulfito de sódio (sozinho ou associado), sendo de 0,01 a 0,03  $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  como conservante e 0,005  $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  como antioxidante em alimentos.

## 2.6 ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM AGENTES ANTIMICROBIANOS

A segurança e garantia de produtos bem conservados, está relacionada com a ação que o conservante fornece para a não deterioração desses produtos frente a micro-organismos indesejáveis. A partir disso, para se atender a demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade, a substituição dos conservantes tradicionais de origem sintética, pelos naturais vem crescendo constantemente na aplicação de produtos. Esses conservantes

---

<sup>3</sup> MACHADO, R. M; TOLEDO, M. C. Sulfitos em alimentos. **Brazilian J. Food Technol**, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

<sup>4</sup> LUCK, E.; JAGER, M. **Conservación química de los alimentos, características, usos, efectos**. Zaragoza, 2º ed, 1995.

naturais são destacados por serem utilizados isolados ou em associação com outras substâncias (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

O uso de associações de substâncias conservantes e antibióticos com produtos naturais de plantas medicinais, que apresentam potencial sinérgico sobre micro-organismos resistentes, se destaca por algumas vantagens, tais como uma nova estratégia para o tratamento de infecções e a redução da toxicidade relacionada à dose utilizada do antibiótico ou substância sintética, já que possibilita o uso de dosagens reduzidas ao ser combinado, sem comprometer sua ação antimicrobiana (ROCHA, 2012).

Os efeitos resultantes das interações entre substâncias (drogas e agentes antimicrobianos) são descritas como, efeito aditivo, indiferente, antagonico e sinérgico (OGA, CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

O efeito aditivo é evidenciado quando o resultado da combinação é igual à soma dos efeitos de cada substância separadamente. O efeito de indiferença ocorre quando o resultado da associação não difere do resultado obtido da substância mais eficaz quando testada sozinha. O antagonismo ocorre quando o resultado da combinação das substâncias é menor que o resultado obtido de cada substância separadamente. O sinergismo é evidenciado quando o resultado da combinação das substâncias é maior que a soma dos efeitos de cada agente em separado, ou seja, o efeito sinérgico de uma substância quando testada proporciona uma maior ação antimicrobiana do que a esperada (ENDO, 2007; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO 2008).

A partir da ação benéfica que as substâncias naturais apresentam, quando associadas a um agente antimicrobiano convencional, vários estudos são realizados para evidenciar tais efeitos. Betoni et al. (2006) realizaram um estudo com diferentes extratos de plantas combinados com agentes antimicrobianos convencionais, observando um potencial sinérgico entre dois agentes antimicrobianos quando testados ao extrato de gengibre e onze agentes associados ao extrato de cravo-da-índia, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

No estudo realizado por Probst (2012), foi evidenciado sinergismo entre o óleo essencial de cravo contra a bactéria *Escherichia coli* e óleo essencial de canela contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, quando combinados com diferentes antibióticos, resultando em valores menores de concentração inibitória mínima que quando testados sozinhos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Obtenção das amostras

As amostras de romã utilizadas foram coletadas no dia 06 de Outubro de 2014, em uma propriedade rural da região Sul da cidade de Toledo, Paraná.

Os óleos essenciais de citronela (lote 1286), cravo (lote 2009), eucalipto (lote 1522), lavanda (lote 1668) e louro (lote 1320) foram obtidos comercialmente da empresa Laszlo Aromaterapia LTDA, certificada na comercialização destes produtos naturais.

Esses óleos foram selecionados de acordo com sua composição química e diversas aplicações que oferecem para aromaterapia, cosmética e alguns em especial para indústria alimentícia. Foram adquiridos da empresa os certificados de análise química de cada óleo contendo os cromatogramas (ANEXO A, B, C, D e E), realizado por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução, a fim de identificar os principais constituintes responsáveis pelas várias aplicações desses óleos essenciais.

Algumas informações sobre os óleos essenciais estão apresentados na Tabela 1, tais como, nome científico, parte da planta utilizada na extração e principais constituintes da composição química do óleo.

**Tabela 1 – Informações sobre o nome científico, parte da planta utilizada e principais constituintes da composição química dos óleos essenciais**

Óleos essenciais	Nome científico	Parte da planta	Composição química (%)
<b>Citronela</b>	<i>Cymbopogon nardus</i>	Folhas	Citonalal (43,24); geraniol (19,98); citronelol (9,56).
<b>Cravo</b>	<i>Syzygium aromaticum</i>	Folhas	Eugenol (88,50); cariofileno (8,60); Acetato de eugenila (1,70).
<b>Eucalipto</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Folhas	1,8-cineol (85,40); $\alpha$ -pineno (8,30); $\beta$ -pineno (2,40); mirreno (0,70).
<b>Lavanda</b>	<i>Lavandula angustifolia</i>	Flores	Acetato de linalila (30,20); Linalol (22,50); 1,8-cineol (4,80); Acetato de lavandulila (4,20); $\alpha$ -terpineol (2,90); Cânfora (2,60).
<b>Louro</b>	<i>Laurus nobilis</i>	Folhas	1,8-cineol (50,40); $\alpha$ -pineno (12,90); Linalol (7,60); acetato de terpinila (6,50); sabineno (4,00); $\alpha$ -terpineol (3,10); Eugenol (2,50).

### 3.1.2 Micro-organismos

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

### 3.1.3 Conservantes sintéticos

Os conservantes sintéticos utilizados neste trabalho foram metilparabeno Biotec (lote 32343) e metabissulfito de sódio Vetec (lote 33495).

### 3.1.4 Reagentes e meios de cultura

Os reagentes utilizados foram: Metanol P.A (Alphatec) Etanol P.A (Alphatec) Clorofórmio P.A (Alphatec), Ácido sulfúrico P.A (Alphatec), Cloreto de bário (Vetec), Cloreto de sódio (Proquímios), DMSO - dimetilsulfóxido (Nuclear), Trolox - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Aldrich) e DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (Aldrich).

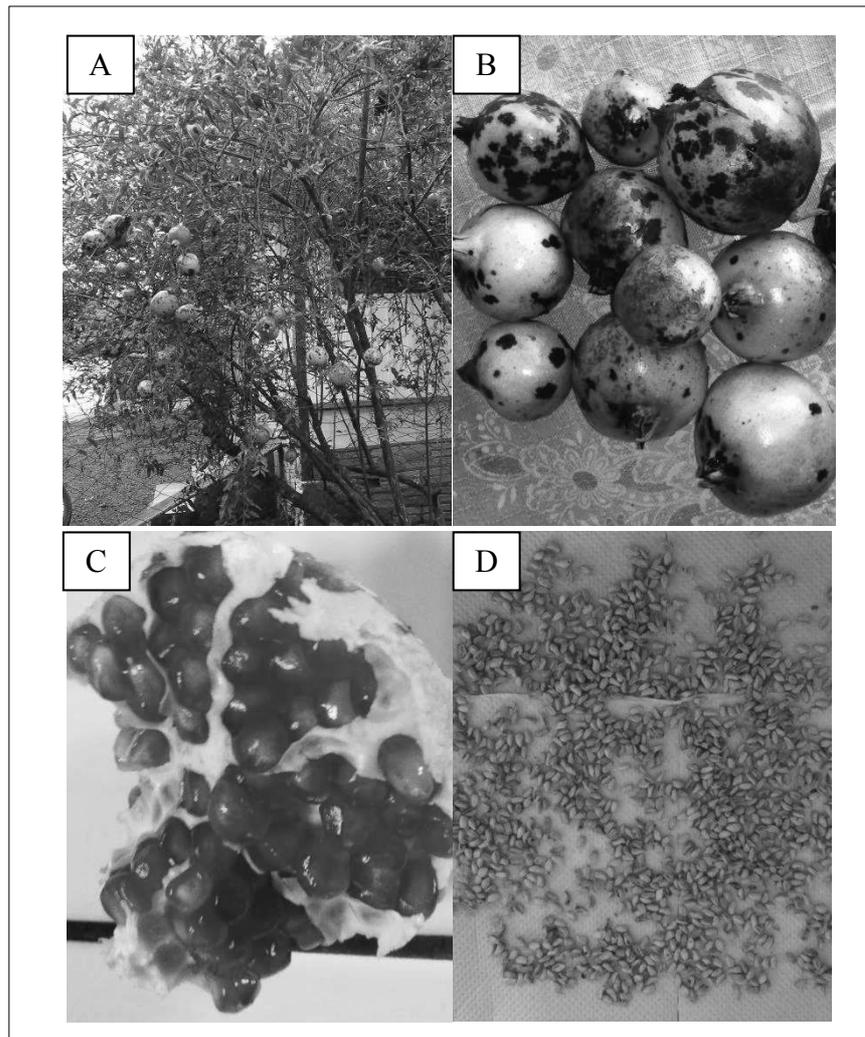
Os meios de cultura utilizados foram: Ágar Mueller-Hinton (Himedia) e caldo Mueller-Hinton (Himedia).

## 3.2 MÉTODOS

As análises deste trabalho foram realizadas nos laboratórios de Química Orgânica, Análise Instrumental e Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo.

### 3.2.1 Preparo das amostras de romã

As amostras de frutos de romã foram coletadas da romãzeira e após previamente lavadas. Em seguida, foram removido os arilos, de forma asséptica para evitar contaminações com as sementes (Figura 7). Após, as sementes foram secas à temperatura ambiente, em local escuro.



**Figura 7- Ilustração da romãzeira (A), fruta (romã) (B), sementes com arilo (C) e sementes secas sem arilo (D)**

**Fonte: autoria própria (2015).**

### 3.2.2 Determinação da umidade da amostra de sementes de romã

A análise de umidade foi realizada conforme o método 935. 29 da AOAC (CUNNIFF, 1998). Primeiramente, a amostra já seca a temperatura ambiente foi triturada em um micro moinho de facas (modelo SL 30 – SOLAB) para aumentar a eficiência na determinação de umidade e extração do óleo.

Cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em um forno mufla (FORNITEC) a 600°C e após colocados em um dessecador para serem resfriados. Em seguida, foram pesados, em balança analítica ( $\pm 0,1000$  g), aproximadamente 3,0 g de

amostra, nos cadinhos de porcelana. Esses foram levados a estufa e mantidos a 105°C por 4 horas. Em seguida, foram transferidos para um dessecador e resfriados por aproximadamente 30 minutos e novamente pesados. O experimento foi realizado em triplicata e o cálculo de porcentagem de umidade foi realizado de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(CV + AU) - CS}{(CV + AU) - CV} \times 100 \quad (1)$$

Onde, CV: cadinho vazio (g); AU: amostra umida (g) e CS: cadinho contendo amostra seca (g).

### 3.2.3 Extração do óleo das sementes de romã

O método utilizado para a extração do óleo foi de acordo com Bligh e Dyer (1959). Após ter obtido o teor de umidade das sementes, foi calculada a quantidade necessária em massa de semente para extração.

Aproximadamente 22,78 g da amostra moída foi colocada em um béquer, e após adicionado água destilada para corrigir a umidade (80%) da amostra.

Em seguida foram homogeneizados 100 mL de clorofórmio P. A. com 200 mL de metanol P. A.. Em seguida, foram adicionados 100 mL de clorofórmio P. A. e agitado por mais 30 segundos, e posteriormente, 100 mL de água destilada e agitado por mais 30 segundos.

A mistura foi filtrada em um funil de Buchner com papel filtro quantitativo. Em seguida, foram adicionados 100 mL de clorofórmio P. A. e foi agitado vigorosamente por 2 minutos. O filtrado foi transferido para um funil de separação.

A fase inferior (clorofórmio) foi coletada em um balão previamente pesado em balança analítica ( $\pm 0,0001$  g). Por fim, foi realizada a evaporação do solvente em um evaporador rotatório, a 36°C e determinado gravimetricamente o teor de óleo obtido das sementes.

Após a extração, foi realizado o cálculo do rendimento de extração de acordo com a equação 2. O óleo obtido foi colocado em tubos de centrifugação estéreis e conservados em congelador (modelo F 32- BOSCH) sob temperatura de -18 °C.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{MO}}{\text{MS}} \times 100 \quad (2)$$

Onde, MO: massa de óleo obtido na extração (g) e MS: massa das sementes utilizadas para extração (g).

### 3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.3.1 Determinação da atividade antioxidante dos óleos pelo método de DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante dos óleos foi utilizado o método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), segundo a metodologia proposta por Choi et al (2002).

Inicialmente foram realizados alguns testes com concentrações variadas para verificar em qual concentração aproximadamente os óleos essenciais e o óleo vegetal extraído de sementes de romã apresentavam capacidade de inibição de 50% do radical DPPH. Em seguida, foram realizadas as análises com seis concentrações diferentes para cada óleo.

Os óleos foram pesados em balão volumétrico de 10,0 mL e diluídos em etanol P.A.. Para a reação, foram coletados 2,5 mL de cada balão contendo a amostra de óleo e foram adicionados em tubo de ensaio. Logo em seguida foram adicionados aos tubos 1,0 mL da solução de DPPH  $3,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> (solução metanólica). Os tubos de ensaio foram agitados em agitador de tubos tipo Vortex (modelo AP56 - PHOENIX) e deixados em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Preparou-se um controle negativo contendo 2,5 mL de etanol em 1,0 mL da solução de DPPH  $3,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Para o branco foi utilizado etanol P. A.

Após o período de 30 minutos em repouso, realizou-se a leitura das amostras nas diferentes concentrações em um espectrofotômetro UV/Vis (modelo T80+ PG Instruments) em 517 nm, onde a solução de DPPH apresentou um máximo de absorção. O experimento foi

realizado em triplicata e o resultado foi expresso em IC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de óleo necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH. O IC<sub>50</sub> de cada óleo foi encontrado através da equação da reta obtida pela curva de porcentagem de inibição *versus* a concentração de óleo.

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a equação 3.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

Onde, A<sub>0</sub>: absorvância do controle negativo (DPPH + Etanol) e A<sub>1</sub>: absorvância da amostra em solução.

Outra forma de expressar os resultados de atividade antioxidante é pelo Índice de Atividade Antioxidante (AAI). Considera-se ação antioxidante fraca quando o AAI for menor que 0,5, ação moderada quando o AAI estiver entre 0,5 e 1,0, ação antioxidante forte quando o AAI for de 1,0 a 2,0, e ação muito forte para valor de AAI for superior a 2,0 (SCHERER; GODOY, 2009).

O Índice de Atividade Antioxidante (AAI) é obtido através da equação 4.

$$\text{AAI} = \frac{\text{concentração final de DPPH (mg mL}^{-1}\text{)}}{\text{IC}_{50}\text{(mg mL}^{-1}\text{)}} \quad (4)$$

Como controle positivo foi utilizado o antioxidante padrão Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A solução padrão de Trolox foi preparada de acordo com Rufino et al. (2007b), onde dissolveu-se 25,0 mg de Trolox em etanol P.A num balão de 50,0 mL, resultando em uma solução  $2,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>. Em seguida foi determinada a atividade antioxidante com o padrão Trolox pelo método de DPPH conforme realizado para as amostras de óleo. Plotou-se as concentrações de Trolox no eixo X e as respectivas absorvâncias no eixo Y e então, obteve-se a equação da reta. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), em µmol ET por grama de amostra.

Para a determinação da curva padrão do DPPH (concentração de DPPH x absorvância), foi utilizada a metodologia de acordo com Rufino et al. (2007a). Preparou-se em balões volumétricos de 10,0 mL, soluções de DPPH em metanol com concentrações de ( $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em triplicata. Em ambiente escuro e temperatura ambiente, transferiu-se aproximadamente 4,0 mL de cada solução de DPPH para cubetas de vidro e realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 517 nm. Metanol foi usado como branco. Em seguida, plotou-se as concentrações de DPPH no eixo X e as respectivas absorvâncias no eixo Y e então, calculou-se a equação da reta.

### 3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

#### 3.4.1 Preparo das soluções de óleo e conservantes sintéticos

Para a realização dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e testes de associação, foram pesados 10,0 mg de cada óleo e em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de DMSO e 900  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton, resultando em uma solução com concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ .

O preparo das soluções dos conservantes sintéticos se procedeu da mesma forma, só variando as concentrações de cada conservante sendo  $15 \text{ mg mL}^{-1}$  para metilparabeno e  $30 \text{ mg mL}^{-1}$  para o metabissulfito de sódio.

#### 3.4.2 Preparo do inóculo bacteriano

O inóculo utilizado para os testes de microdiluição foi preparado de acordo com a escala McFarland, que obtém uma turvação correspondente a 0,5. Esse padrão é equivalente a aproximadamente  $1,5 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  (CLSI, 2012).

Para padronizar a densidade da suspensão bacteriana, utilizou-se um controle de turbidez de  $\text{BaSO}_4$  (sulfato de bário), equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5.

Para o preparo da solução padrão McFarland 0,5, primeiramente em um tubo de ensaio acrescentou-se uma alíquota de 0,5 mL de cloreto de bário ( $\text{BaCl}_2$  de  $0,048 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em 99,5 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  de  $0,18 \text{ mol.L}^{-1}$ ), agitando constantemente para manter a suspensão da solução. Em seguida, foi realizada a leitura dessa solução em espectrofotômetro UV/Vis (modelo T80+ PG Instruments) em um comprimento de onda de 625 nm, obtendo uma absorvância de 0,089. Por fim, a solução McFarland 0,5 foi transferida para tubos de ensaio com tampa e foram armazenados em local escuro sob temperatura ambiente. A cada duas semanas de testes foi realizada a leitura da absorvância do padrão, para certificar-se que não sofreu degradação. A absorvância em 625 nm da solução padrão McFarland com turvação 0,5 deve estar entre 0,08 e 0,10 equivalente a aproximadamente  $1,5 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  (CLSI, 2012).

Para os testes de microdiluição foram realizados os ajustes da turbidez das suspensões bacterianas, com uma solução salina 0,85% previamente estéril, de modo a obter-se uma turbidez ótica comparável à solução padrão McFarland 0,5. Em seguida, foram realizadas diluições de 1:20 (950  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton e 50  $\mu\text{L}$  da cultura de cada bactéria) já padronizada em salina 0,85% com o padrão McFarland 0,5, em microtubos de centrifugação estéreis, para a obtenção de uma solução com aproximadamente  $0,75 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$ .

### 3.4.3 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos e conservantes sintéticos

A determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), pelo teste de microdiluição para bactérias.

Os testes de microdiluição foram realizados em microplacas (KASVI) para cultura de células, estéreis, com 96 poços, em câmara de fluxo unidimensional (BIOENG09).

Inicialmente, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton, com o auxílio de um micropipetador multicanal, em todos os poços da microplaca. As soluções de óleo a serem testados, na concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram adicionados nos primeiros poços da linha A. Em seguida, realizaram-se as diluições seriadas dos óleos em sentido vertical, aspirando e soltando continuamente as soluções em cada poço da microplaca, com exceção da linha H, sendo que o poço seguinte apresentava a metade da concentração do poço anterior. Inoculou-

se, com auxílio de um micropipetador monocanal, 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana padronizada 1:20 em todos os poços da coluna 1, 3, 5, 7, 9 e 11 ( $7,5 \times 10^4$  UFC/poço). Os outros poços foram utilizados como controle de cada óleo (óleo + caldo Mueller-Hinton). A linha H foi utilizada como controle negativo (bactéria + caldo Mueller-Hinton). Foi realizado também um controle de esterilidade do caldo e um controle com DMSO, para a certificação que não apresentasse potencial de inibição frente às bactérias testadas.

Por fim, as microplacas foram cuidadosamente agitadas e incubadas em uma estufa BOD (modelo TE371 – Tecnal) a temperatura de  $35^\circ\text{C}$ , por um período de 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura dos resultados, observando a presença ou ausência de crescimento bacteriano visível na microplaca. Para isso, observou-se qual o último poço de cada coluna isento de crescimento bacteriano, ou seja, os poços que apresentaram ausência de turvação visível, são considerados como a concentração inibitória mínima frente à bactéria testada.

O procedimento foi o mesmo para os conservantes sintéticos, só variando as concentrações iniciais de cada um, sendo  $15 \text{ mg.mL}^{-1}$  para metilparabeno e  $30 \text{ mg.mL}^{-1}$  para metabissulfito de sódio. O experimento com os óleos e conservantes sintéticos foi realizado em triplicata.

#### 3.4.4 Avaliação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os óleos e conservantes sintéticos

Para a determinação da concentração bactericida mínima dos óleos e conservantes sintéticos, foram retiradas alçadas com auxílio de alças bacteriológicas, dos poços correspondentes à concentração inibitória mínima e as concentrações anteriores a esta. O método utilizado foi o de espalhamento em estrias sobre a superfície de Ágar Mueller-Hinton contido em placas de Petri.

Em seguida, as placas foram incubadas a uma temperatura de  $35^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após este período realizou-se a leitura verificando se houve ou não crescimento visível sobre o ágar. Considerou-se a concentração bactericida mínima a menor concentração de óleo ou conservante sintético capaz de causar a morte ou redução no crescimento bacteriano igual ou superior a 99,9%.

### 3.4.5 Teste de associação dos óleos com conservantes sintéticos pela técnica de “checkerboard”

Os óleos que apresentaram melhor desempenho frente às bactérias foram associados com os conservantes sintéticos metilparabeno e metabissulfito de sódio, que são comumente utilizados em alimentos e cosméticos. A técnica utilizada foi a de “checkerboard” em microplacas de 96 poços.

Inicialmente foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de caldo Mueller-Hinton nos poços da microplaca, com exceção do poço 12A, que recebeu 200  $\mu\text{L}$  da solução de óleo na concentração de 10  $\text{mg mL}^{-1}$ . Os demais poços da coluna 12 receberam 100  $\mu\text{L}$  da solução de óleo na concentração de 10  $\text{mg mL}^{-1}$  cada. Realizou-se uma diluição seriada em sentido horizontal até a coluna 2 da microplaca. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de conservante sintético (15  $\text{mg mL}^{-1}$  de metilparabeno ou 30  $\text{mg mL}^{-1}$  de metabissulfito de sódio) e, seguiu-se a diluição seriada em sentido vertical até a linha G da microplaca. A linha H e a coluna 1 foram os controles do óleo e conservante sintético, respectivamente. Cada poço da microplaca apresentava combinações de diferentes concentrações de óleo e conservante sintético. Em seguida, foram adicionados a todos os poços da microplaca 10  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana padronizada em escala McFarland 0,5 diluídas 1:20. Por fim, a microplaca foi agitada cuidadosamente e incubada a uma temperatura de 35°C durante 24 horas.

Após este período foi realizada a leitura através da observação de inibição ou crescimento visível na microplaca. O crescimento foi evidenciado através de turvação.

A análise dos resultados é feita através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) dos óleos e conservantes sintéticos, a partir da equação 5.

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \frac{\text{CIM}_A \text{ em combinação}}{\text{CIM}_A \text{ isolado}} + \frac{\text{CIM}_B \text{ em combinação}}{\text{CIM}_B \text{ isolado}} \quad (5)$$

Onde, FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionada;  $\text{FIC}_A$ : Concentração Inibitória Fracionada do óleo;  $\text{FIC}_B$ : Concentração Inibitória Fracionada do conservante sintético;  $\text{CIM}_A$ : Concentração Inibitória Mínima do óleo e  $\text{CIM}_B$ : Concentração Inibitória Mínima do conservante sintético.

Desta forma, os resultados de cada óleo em associação ao conservante sintético foram classificados, de acordo com o FICI, em sinérgicos ( $FICI \leq 0,5$ ), aditivos (FICI entre 0,5 e 1,0), indiferentes (FICI entre 1,0 e 4,0) ou antagonicos ( $FICI \geq 4,0$ ) (LEWIS et al., 2002).

Os resultados do teste de “checkerboard” também foram interpretados pelo padrão formado pela construção de gráficos denominados isobogramas, onde uma das substâncias testadas fica ao longo do eixo X e a outra ao longo do eixo Y. Ao realizar a conexão da série de pontos referentes à combinação do óleo e conservante sintético, obtém-se o isobograma onde ocorre inibição do crescimento microbiano (SHIN; LIM, 2004; ENDO, 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção do óleo vegetal de sementes de romã

Foi realizada inicialmente a extração do óleo vegetal contido nas sementes de romã, através do método de Bligh e Dyer (1959). Para determinar a quantidade em massa de amostra a ser extraída, foi necessária a determinação do teor de umidade, pois o método de extração realizado é aplicado para amostras com até 80 % de umidade. As sementes de romã apresentaram uma umidade de 12,15 % ( $\pm 0,14$ ). De acordo com a ANVISA (1978), os cereais, incluindo grãos e sementes devem apresentar no máximo 15 % de umidade, devido aos riscos de contaminação que podem ocorrer. Um alto teor de umidade em sementes pode ocasionar um aumento na respiração, promovendo o aparecimento de micro-organismos e como consequência a perda de matéria-prima (MOHLER, 2010).

Segundo Lansky e Newman (2006), o teor de lipídeos presentes nas sementes de romã, compreende de 12 a 20 % do peso total da semente, apresentando um alto teor do ácido graxo (ácido punícico) em sua composição. O rendimento obtido pela extração do óleo neste trabalho foi de aproximadamente 13,43 %. Esse valor está próximo ao rendimento encontrado por Jardini e Mancini Filho (2007), que foi de 14,06 % de óleo nas sementes da fruta. No entanto, o rendimento e a composição dos ácidos graxos extraídos de óleos vegetais podem apresentar variações de acordo com a maturação do fruto, localização, época de colheita, condições climáticas, dentre outros vários fatores (MELO, 2012a).

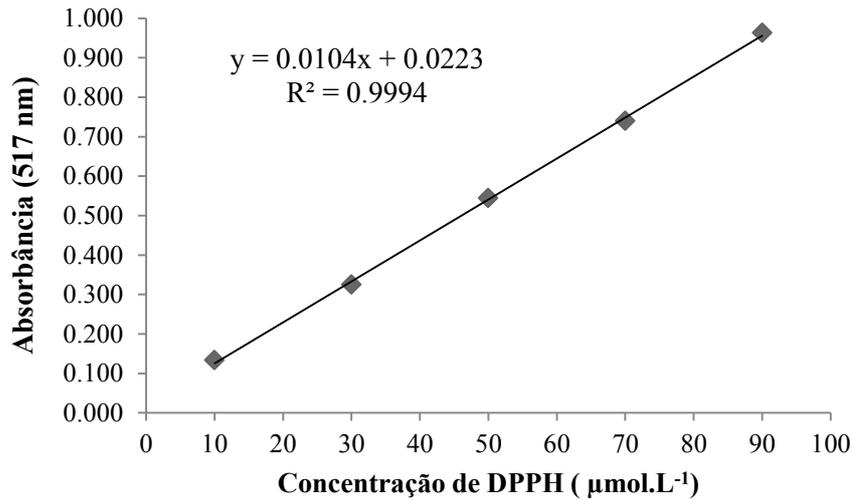
Desta forma, faz-se necessário realizar um controle das condições do fruto e da umidade, para que não ocorra perda da amostra e dos principais compostos presentes, como também para se obter uma quantidade considerável de lipídios ao final da extração.

### 4.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante dos óleos em estudo, utilizou-se o método do DPPH. A atividade antioxidante é determinada pelo grau de descoloração da solução metanólica de DPPH, que inicialmente é violeta e torna-se amarela

proporcionalmente à capacidade do antioxidante em sequestrar o radical livre (POVH, 2008). Os resultados foram expressos através da quantidade de antioxidante capaz de sequestrar metade (50 %) dos radicais livres DPPH presentes na solução.

A curva padrão de DPPH encontra-se na Figura 8.



**Figura 8- Curva padrão de DPPH**

A metodologia utilizada para a construção da curva padrão foi proposta por Rufino et al. (2007a) com algumas modificações. Conforme o coeficiente de determinação obtido pela curva (Figura 8) obteve-se uma boa linearidade.

Para as análises com os óleos, foram realizados testes para obter concentrações que apresentassem capacidade abaixo e acima de 50% na inibição do radical DPPH, para a construção de uma curva linear entre a concentração do antioxidante e sua a porcentagem de inibição (Figura 9). A partir disso, todos os óleos apresentaram concentrações diferentes na capacidade de inibição. O cálculo do IC<sub>50</sub> foi realizado pela equação 3.

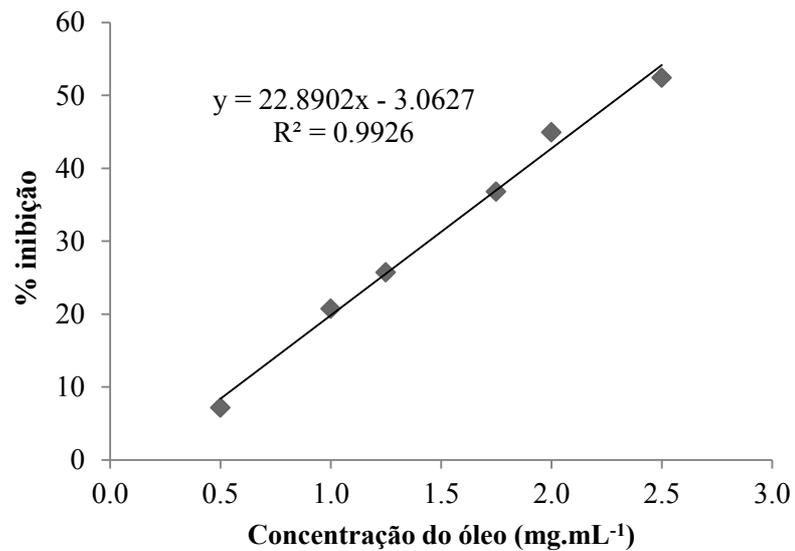


Figura 9– Exemplo de curva utilizada para a determinação da equação da reta para os óleos

De acordo com a Figura 9, a medida que aumenta a concentração do óleo utilizado, aumenta a capacidade de inibir o radical DPPH.

Foi realizado também, como controle positivo uma análise com o reagente Trolox, que é um antioxidante padrão conhecido pela inibição de radicais livres.

A curva padrão de Trolox encontra-se na Figura 10.

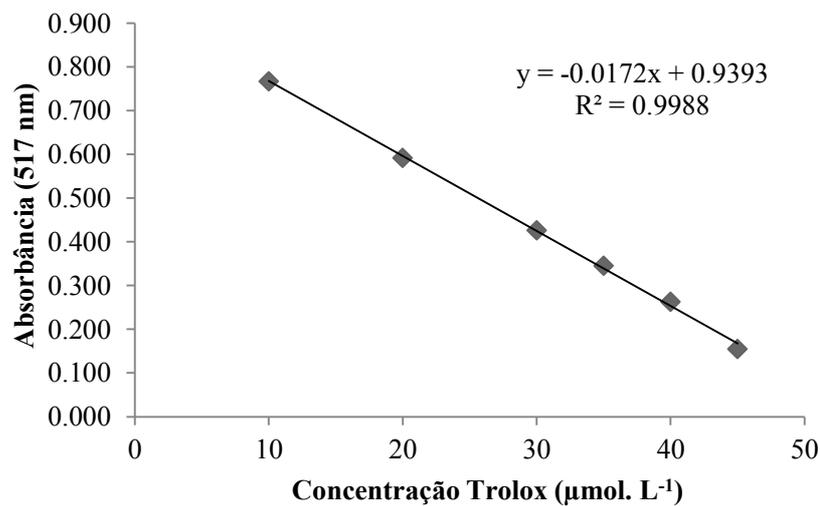


Figura 10 - Curva padrão de Trolox

Conforme a Figura 10 observa-se que quando se aumenta a concentração de Trolox a absorbância diminui, ou seja, ocorre a inibição do radical DPPH. Desta forma, os resultados

também foram apresentados em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox), em  $\mu\text{mol ET}$  por grama de óleo.

Os resultados de  $\text{IC}_{50}$ , Índice de Atividade antioxidante e capacidade antioxidante em equivalente Trolox para cada óleo, são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2 – Valores de  $\text{IC}_{50}$ , Índice de Atividade Antioxidante (AAI) e capacidade antioxidante em equivalente Trolox (TEAC) obtidos para cada óleo na determinação do potencial antioxidante pelo método de DPPH**

Óleos	$\text{IC}_{50}$ ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) $\pm$ DP	AAI	TEAC ( $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ )
<b>Citronela</b>	0,99 $\pm$ 0,010	0,03	28,50
<b>Cravo</b>	0,008 $\pm$ 0,010	3,93	3125,70
<b>Eucalipto</b>	> 15,00 $\pm$ 0,000	< 2,25x10 <sup>-3</sup>	-
<b>Lavanda</b>	> 15,00 $\pm$ 0,000	< 2,25x10 <sup>-3</sup>	-
<b>Louro</b>	0,24 $\pm$ 0,019	0,14	109,62
<b>Semente de romã</b>	2,32 $\pm$ 0,015	0,01	11,99

Nota: Os símbolos < e > representam menor e maior respectivamente; (-) Não determinado.  
DP: Desvio padrão

Dentre os óleos testados, os óleos essenciais de lavanda e eucalipto foram os menos eficazes na ação antioxidante, pois não apresentaram inibição de 50% do radical DPPH mesmo com a maior concentração testada (15,00  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Desta forma, a utilização desses óleos essenciais como antioxidantes se torna inviável, devido à grande quantidade de óleo necessária para promover a redução do radical livre.

A partir disso, não foi possível calcular os valores reais de  $\text{IC}_{50}$ , AAI e TEAC para esses óleos, mas estimou-se que estes óleos essenciais apresentavam valores de  $\text{IC}_{50}$  maiores que 15,00  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e AAI menores que 2,25x10<sup>-3</sup>.

Malinowski (2010) realizou um estudo da capacidade antioxidante com o óleo essencial de espécies de eucalipto e também verificou que esse óleo não apresentou capacidade de reduzir o radical DPPH, como também não apresentou variações na coloração permanecendo na cor violeta escuro, mesmo na maior concentração testada (6,0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

O principal composto presente no óleo essencial de eucalipto utilizado nesse estudo foi o 1,8-cineol, presente em aproximadamente 85,4 %. De acordo com Toscan (2010), que avaliou a atividade antioxidante de terpenoides, esse composto precisa de um  $\text{IC}_{50}$  muito alto

(86,07  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ) para a inibição do radical DPPH, constatando sua baixa atividade antioxidante.

Os principais constituintes presentes na composição do óleo essencial de lavanda utilizado neste trabalho são; acetato de linalila (30,2 %), linalol (22,5 %) e 1,8-cineol (4,8 %). Com relação a este óleo essencial, são poucos os estudos voltados na determinação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, por ser considerado um fraco antioxidante na inibição do radical. No entanto são evidenciadas outras propriedades para esse óleo, tais como, para fins terapêuticos, aplicações em cosméticos e perfumes e também como antimicrobiano, sendo que tais propriedades devem-se pela presença de linalol e acetato de linalila em sua composição (CAVANAGH; WILKINSON, 2002; SILVEIRA, 2012).

Dentre os outros óleos apresentados na Tabela 2, o óleo essencial de cravo foi o mais eficaz na inibição de 50% do radical DPPH, com uma concentração de 0,008  $\text{mg.mL}^{-1}$  e AAI de 3,93 classificado como um antioxidante de ação muito forte, seguido do óleo essencial de louro (0,24  $\text{mg.mL}^{-1}$ ), citronela (0,99  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e do óleo vegetal extraído de sementes de romã (2,32  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) com AAI de 0,138, 0,034, 0,014 respectivamente, classificados como antioxidantes de ação fraca.

O valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido para o óleo essencial de cravo neste trabalho está próximo ao encontrado por Scherer et al. (2009) que foi de 0,0078  $\text{mg.mL}^{-1}$ , confirmando seu alto potencial antioxidante.

Com relação aos valores de capacidade antioxidante equivalente ao padrão Trolox, observa-se que quanto menor o  $\text{IC}_{50}$ , maior é a concentração de TEAC. Dentre os óleos avaliados, o óleo essencial de cravo apresentou a maior concentração (3125,70  $\mu\text{mol TEAC.g}^{-1}$ ).

A alta atividade antioxidante do óleo essencial de cravo deve-se principalmente ao eugenol, composto encontrado em maior quantidade nas folhas dessa planta (88,5 %). A ação desse composto está relacionada a sua estrutura química, ou seja, o anel fenólico que permite a doação de um próton ( $\text{H}^+$ ) ao radical livre, estabilizando e interrompendo o mecanismo de oxidação do mesmo (RAMALHO; JORGE, 2006).

O óleo essencial de louro foi o segundo óleo mais eficaz no sequestro de radicais livres do DPPH. O resultado obtido neste trabalho foi superior ao encontrado por Moraes et al. (2009), que analisaram o potencial antioxidante desse condimento adquirido comercialmente, resultando em um  $\text{IC}_{50}$  de 0,76  $\text{mg.mL}^{-1}$ . Seu potencial contra radicais livres deve-se por apresentar em sua composição compostos fenólicos, como o eugenol, linalol e  $\alpha$ -terpineol, que apresentam alta ação antioxidante. No entanto, esse óleo essencial apresenta

concentrações de eugenol menores que o óleo essencial de cravo, o que justifica um valor maior  $IC_{50}$  e conseqüentemente foi classificado como um antioxidante com uma menor ação.

O óleo essencial de citronela utilizado neste estudo possui como constituintes majoritários o citronelal (43,24 %), geraniol (19,98 %) e citronelol (9,56 %). O resultado de  $IC_{50}$  obtido (0,99  $mg.mL^{-1}$ ) foi maior que o encontrado por Scherer et al. (2009) que foi de 0,74  $mg.mL^{-1}$  pelo método do DPPH. Entretanto, o óleo essencial também apresentou um AAI abaixo de 0,5, sendo classificado como um antioxidante com ação fraca.

A ação antioxidante dos óleos essenciais deve-se principalmente pela presença de compostos fenólicos em sua composição. No entanto, os compostos como flavonóides e terpenoides também oferecem alto potencial sobre os óleos. Essas substâncias, tem o poder de neutralizar os radicais livres, impedindo que ocorra a oxidação lipídica (HUI, 1996; JARDINI, 2005).

O óleo vegetal extraído de sementes de romã foi selecionado devido aos estudos relacionados à alta atividade antioxidante do fruto, como também por possível potencial antimicrobiano. A concentração inibitória de 50 % do radical DPPH pelo óleo foi de aproximadamente 2,32  $mg.mL^{-1}$ . Esse valor de  $IC_{50}$  foi inferior ao encontrado por Melo (2012), que avaliou a capacidade antioxidante na redução do DPPH do óleo de semente de romã em comparação ao óleo de linhaça, obtendo um  $IC_{50}$  de 3,77 mg de óleo de romã para a redução do radical.

No estudo realizado por Nascimento et al. (2013), a capacidade antioxidante do extrato etanólico de sementes de romã contendo arilo foi avaliada, obtendo-se um valor de 23,33  $\mu mol TEAC.g^{-1}$  de amostra. O potencial antioxidante deste óleo deve-se aos ácidos graxos presentes nas sementes, chegando a até 95% de sua composição. No entanto, o ácido púnicico, presente em maior quantidade se destaca, por possuir uma longa cadeia carbônica com algumas insaturações, que em contato com o radical livre promove a sua estabilização (LANSKY; NEWMAN, 2006; MELO et al., 2014).

Entretanto, no estudo realizado por Silva et al. (2012), que avaliou a atividade antioxidante do óleo extraído de sementes de romã aplicando a técnica de prensagem a frio, encontrou um resultado de  $IC_{50}$  de aproximadamente 37,98  $\mu g.mL^{-1}$ , ou seja, um valor bem abaixo comparado com o obtido neste trabalho. Contudo, a questão da variação nos valores encontrados da capacidade antioxidante deste óleo, como também para os óleos essenciais, está diretamente relacionada a alguns fatores como, método de extração do óleo, umidade das amostras, condições climáticas, espécie, época de colheita (nível de maturação), entre outros (ANDRADE et al., 2012; MELO, 2012a).

Além disso, outro ponto importante é a caracterização do óleo, ou seja, caracterizar e quantificar os principais ácidos graxos presentes nas sementes responsáveis por seu potencial antioxidante. Desta forma, por não ter as informações quantificadas sobre a composição do óleo vegetal extraído das sementes, através da técnica de Cromatografia Gasosa (CG), acabam dificultando a análise da eficácia do óleo, como também as comparações com outros trabalhos.

#### 4.3 Determinação da atividade antimicrobiana dos óleos e conservantes sintéticos pelas técnicas de CIM e CBM

A técnica utilizada para quantificar a atividade antimicrobiana dos óleos e conservantes sintéticos contra as bactérias patogênicas, foi através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Os resultados obtidos para os óleos nas técnicas de CIM e CBM estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 – Valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para os óleos testados contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas**

Micro-organismos	Citronela	Cravo	Eucalipto	Lavanda	Louro	Semente de romã
	CIM/CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )					
<i>Bacillus cereus</i>	1,25/2,50	1,25/2,50	0,00/0,00	0,00/0,00	0,00/0,00	0,00/0,00
<i>Escherichia coli</i>	2,50/2,50	1,25/1,25	0,00/0,00	5,00/0,00	5,00/5,00	0,00/0,00
<i>Salmonella typhi</i>	0,00/0,00	1,25/1,25	0,00/0,00	0,00/0,00	0,00/0,00	0,00/0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,50/2,50	2,50/2,50	0,00/0,00	5,00/0,00	5,00/0,00	0,00/0,00

Conforme os resultados apresentados na Tabela 3 pode-se perceber que o óleo essencial de eucalipto e o óleo vegetal de sementes de romã não apresentaram potencial na inibição de nenhuma das bactérias utilizadas.

Estanislau et al. (2001) avaliaram a atividade antibacteriana de cinco espécies de eucalipto frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dentre as espécies avaliadas, o

óleo essencial de *Eucalypto microcorys* pode ser comparado com a espécie *globulus*, utilizada neste trabalho, devido possuir aproximadamente 86,72% do composto 1,8-cineol em sua composição. Dentre as espécies, essa foi a menos eficaz no efeito antibacteriano, evidenciando uma fraca ação do terpenoide 1,8-cineol, conforme o resultado obtido neste trabalho. No entanto o óleo essencial da espécie *Eucalypto citriodora* (82,33% citronelal e 0,93% 1,8-cineol), foi ativo frente a todas as bactérias.

Contudo, a maior pesquisa com o óleo essencial de eucalipto é sobre fungos. Alguns estudos evidenciaram a sua ação frente a *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, considerados patógenos de plantas e alimentos e também produtores de aflatoxinas (VILELA, 2007).

O óleo de sementes de romã não apresentou atividade mesmo na maior concentração testada de 5,0 mg.mL<sup>-1</sup>, se tornando ineficaz para as possíveis associações com conservantes. Entretanto, é evidenciada alta atividade antimicrobiana em extratos da casca deste fruto. Alguns estudos evidenciaram sua ação frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus vulgaricus* (AHMED; ABOOD; AL-JANABI, 2012; SILVA, 2008).

O óleo essencial das folhas de cravo foi o mais eficaz apresentando potencial bacteriostático e bactericida frente às quatro bactérias testadas. Dentre os micro-organismos em teste, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* foram as mais sensíveis ao óleo essencial, ambas com CIM de 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, seguido por *Staphylococcus aureus* (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>). Com relação à concentração bactericida mínima, ou seja, a concentração mínima do óleo essencial suficiente para causar a morte da célula bacteriana, o óleo essencial de cravo apresentou maior CBM frente à *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* (1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, seguido por *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (2,5 mg.mL<sup>-1</sup>).

O principal composto responsável pela alta ação antimicrobiana deste óleo é o eugenol presente em 88,5 % de sua composição total. Os resultados positivos corroboram com os encontrados por Scherer et al. (2009), que evidenciaram a atividade do óleo essencial de cravo para as mesmas bactérias utilizadas neste trabalho.

Rabêlo (2010), também encontrou resultados satisfatórios para o óleo essencial de cravo, sendo o eugenol composto majoritário apresentando ação frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Salmonella spp.*

A atividade antimicrobiana do eugenol pode ser atribuída à sua estrutura química, em especial ao anel fenólico. Estudos indicam que esse composto fenólico é ativo frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas provocando a degeneração das proteínas da

membrana resultando em um rompimento da parede celular ou lise da célula bacteriana (DI PASQUA et al., 2007; DEVI et al., 2010).

O óleo essencial de citronela também apresentou potencial antimicrobiano, sendo mais eficaz para a bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* com CIM de 1,25 mg.mL<sup>-1</sup>, seguido por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, com CIM de 2,50 mg.mL<sup>-1</sup>. O potencial bactericida do óleo foi evidenciado para as três bactérias na concentração de 2,50 mg.mL<sup>-1</sup>. A única bactéria que não apresentou inibição ao óleo foi *Salmonella typhi* se mostrando resistente na maior concentração testada (5,0 mg.mL<sup>-1</sup>). As bactérias Gram-negativas apresentam uma maior resistência, quando comparadas com as Gram-positivas por possuírem além da camada de peptidoglicano, uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos e lipoproteínas que conferem uma maior impermeabilidade de alguns agentes antimicrobianos (DORMAN; DEANS, 2000).

Scherer et al. (2008) e Silveira et al. (2012) avaliaram a ação do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas obtendo resultados satisfatórios. A ação desse óleo essencial se deve por possuir ricos monoterpenoides como, citronelal (43,24%), citronelol (9,56%) e geraniol (19,98%) em sua composição. Os compostos citronelal e citronelol diferem entre si apenas em suas funções químicas, uma vez que o primeiro é um aldeído e o segundo um álcool (TOSCAN, 2010).

Os óleos essenciais de lavanda e louro apresentaram potencial antimicrobiano somente para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambos na maior concentração testada (5,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Com relação à concentração bactericida mínima, o óleo essencial de louro apresentou potencial somente contra cepas de *Escherichia coli* na concentração de 5,0 mg.mL<sup>-1</sup>. O óleo essencial de lavanda não apresentou CBM para nenhuma das bactérias.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram poucas variações em relação aos de Silveira et al. (2012) que avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e flores de lavanda observando seu efeito contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Contudo, os constituintes do óleo essencial de uma mesma espécie de lavanda podem variar consideravelmente dependendo do método de extração e forma de cultivo da planta.

Os principais componentes do óleo essencial das flores de lavanda são o acetato de linalila (30,22%) e o linalol (22,50%), no entanto outros terpenos em menor quantidade, como  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pineno, lavandulol, 1,8-cineol, também auxiliam no potencial contra micro-organismos. No óleo essencial de louro estão presentes os constituintes principais, 1,8-cineol (50,40%),  $\alpha$ -pineno (12,90%), linalol (7,60%) e eugenol (2,50%). Estudos

revelam que a atividade biológica dos terpenos e terpenoides está relacionada ao grupo hidroxil ligado aos anéis fenólicos, como também, a presença de elétrons deslocalizados na estrutura (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

De acordo com Houghton et al. (2007) muitas vezes a atividade biológica dos óleos essenciais não é realizada somente pelos compostos majoritários. Assim, o efeito pode ser atribuído às substâncias que estão presentes em menor quantidade ou também pela associação destas com outros compostos existentes, promovendo um efeito sinérgico do óleo essencial.

Na Tabela 4, estão descritos os resultados obtidos pelas técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os conservantes sintéticos metilparabeno e metabissulfito de sódio.

**Tabela 4 – Valores de concentração inibitória mínima(CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para os conservantes sintéticos contra bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas**

Micro-organismos	Metilparabeno	Metabissulfito de sódio
	CIM/CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )	CIM/CBM (mg.mL <sup>-1</sup> )
<i>Bacillus cereus</i>	1,87/3,75	1,87/1,87
<i>Escherichia coli</i>	0,93/3,75	1,87/1,87
<i>Salmonella typhi</i>	1,87/3,75	1,87/1,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	3,75/7,50	1,87/1,87

O conservante sintético metilparabeno apresentou efeito de inibição e lise frente às quatro bactérias testadas, mostrando-se mais eficaz para a bactéria *Escherichia coli* (0,93 mg.mL<sup>-1</sup>), seguida por *Bacillus cereus* e *Salmonella typhi* (1,87 mg.mL<sup>-1</sup>) e *Staphylococcus aureus* (3,75 mg.mL<sup>-1</sup>) que apresentou uma resistência maior ao conservante.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece a utilização desse conservante em alimentos sob uma concentração máxima de aproximadamente 0,30 mg.mL<sup>-1</sup>. De acordo com os valores obtidos neste trabalho, o conservante metilparabeno utilizado apresentou concentrações de inibição superiores ao permitido em alimentos. No entanto, para aplicação em cosméticos mostrou eficácia quando testado frente às quatro bactérias, já que a concentração máxima permitida é de 4,0 mg.mL<sup>-1</sup>.

A atividade antimicrobiana dos parabenos está relacionada ao comprimento da cadeia carbônica do substituinte do éster, característica esta indesejável do ponto de vista da solubilidade em água, ou seja, o metilparabeno apresenta-se mais solúvel em água, porém

com uma ação antimicrobiana menor que o propilparabeno, devido às diferenças na estrutura química (FERNANDES; SAVINO; AMARANTE, 2013). Alguns estudos sugerem que estes compostos lipofílicos atuam na inibição ou levam a morte os micro-organismos, devido a alteração da permeabilidade das membranas celulares, como também pela interferência em reações metabólicas essenciais para o desenvolvimento e atividade celular (CARREIRA, 2008; MELO, 2012b).

O conservante metabissulfito de sódio apresentou o mesmo valor de CIM e CBM para todas as bactérias ( $1,87 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Em comum com o metilparabeno apresentou concentrações de inibição superiores a concentração máxima da utilização do conservante em alimentos.

Estudos indicam que a atividade bactericida do metabissulfito de sódio está relacionada ao pH do meio, por ser caracterizado como um agente oxidante ativo a um pH baixo (BOSTAN et al., 2013).

#### 4.4 Associação dos óleos com conservantes sintéticos pela técnica de “checkerboard”

As associações foram realizadas com o óleo essencial de cravo e citronela, por apresentarem os melhores resultados nos testes de CIM frente às bactérias avaliadas.

Os esquemas de “checkerboard” (APÊNDICE A) representam a microplaca de 96 poços contendo as combinações diferentes entre o óleo essencial e o conservante sintético.

Na Tabela 5, estão descritos os valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) das associações entre óleo essencial de cravo e metilparabeno; óleo essencial de citronela e metilparabeno e do óleo essencial de cravo e metabissulfito de sódio, contra as bactérias Gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*.

**Tabela 5 – Valores de Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) das combinações de óleo com os conservantes sintéticos contra bactérias patogênicas e seus respectivos desvios padrões (DP)**

Micro-organismos	Óleo essencial x Conservante sintético		
	CRAVO x MTP	CITRONELA x MTP	CRAVO x MBS
	<b>FICI ± DP</b>		
<i>Bacillus cereus</i>	0,75 ± 0,00	0,62 ± 0,00	0,75 ± 0,09
<i>Escherichia coli</i>	0,49 ± 0,00	0,75 ± 0,16	0,75 ± 0,00
<i>Salmonella typhi</i>	0,49 ± 0,00	-	0,62 ± 0,09
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,56 ± 0,04	0,75 ± 0,09	0,75 ± 0,00

Nota: MTP: metilparabeno e MBS: metabissulfito de sódio.

Na associação entre o óleo essencial de cravo e conservante metilparabeno, observou-se que os melhores resultados de índice de concentração inibitória fracionada foram frente as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* (FICI - 0,49), evidenciando o efeito sinérgico dessas substâncias.

Na associação contra *Escherichia coli*, foi possível verificar que a CIM do conservante metilparabeno reduziu de 0,937 mg.mL<sup>-1</sup> para 0,234 mg.mL<sup>-1</sup> quando associado com 0,312 mg.mL<sup>-1</sup> do óleo essencial de cravo. Na combinação com *Salmonella typhi* a redução do conservante também foi visualizada, sendo de 1,87 mg.mL<sup>-1</sup> para 0,468 mg.mL<sup>-1</sup> na presença da mesma concentração de óleo. Desta forma, a associação dessas substâncias resultou em uma maior atividade antimicrobiana do que a esperada para cada substância se utilizada individualmente, como também em uma possível redução do conservante sintético na presença de baixas concentrações do óleo essencial.

Nas associações frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (FICI – 0,56) e *Bacillus cereus* (FICI – 0,75), foi observado efeito aditivo. A partir disso, mesmo com a redução da concentração inibitória mínima do conservante sintético na presença do óleo essencial, não se torna interessante realizar a associação dessas substâncias frente essas bactérias, por apresentarem um potencial de ação em comum se utilizadas isoladamente. O efeito obtido nas interações entre o óleo essencial de cravo e metilparabeno frente às quatro bactérias pode ser visualizado a partir dos isobogramas da Figura 11.

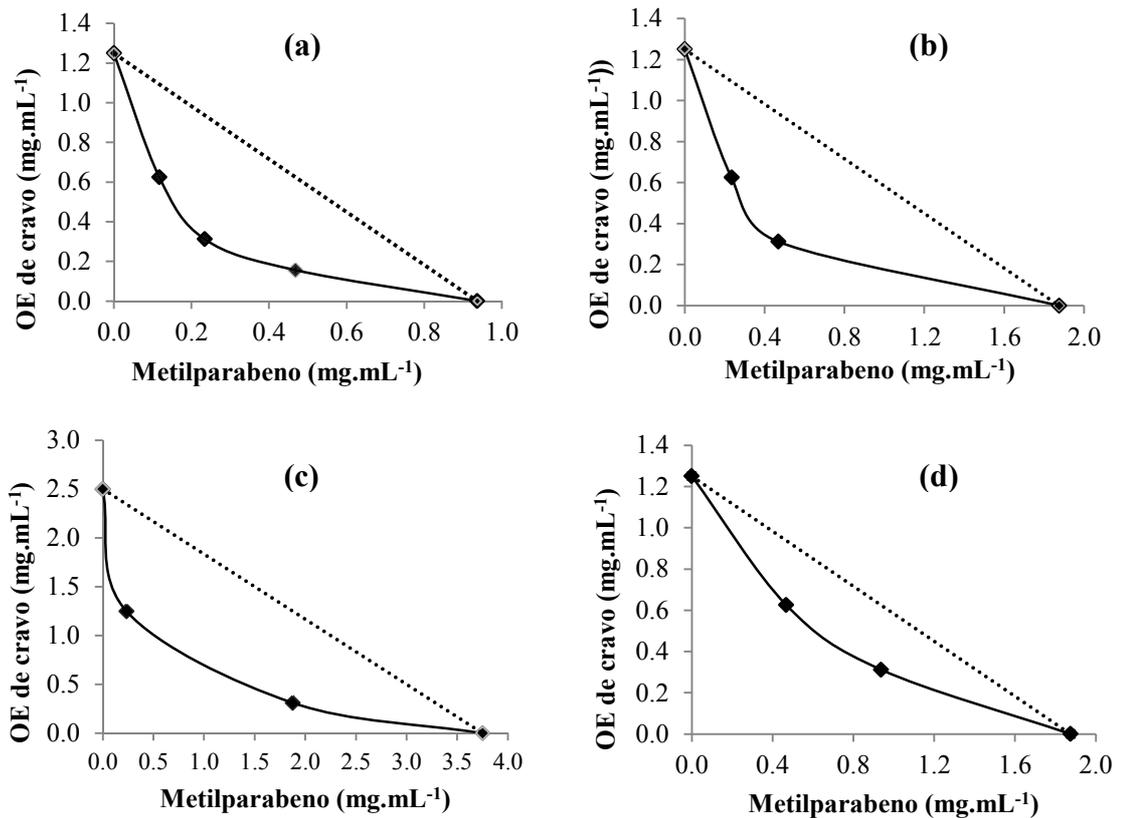


Figura 11- Isobologramas obtidos através da associação entre o óleo essencial de cravo e o conservante sintético metilparabeno contra as bactérias (a) *Escherichia coli*; (b) *Salmonella typhi*; (c) *Staphylococcus aureus*; (d) *Bacillus cereus*. A linha pontilhada indica o comportamento aditivo teórico.

A partir dos isobologramas, é possível verificar geometricamente o tipo de efeito resultante na associação do óleo e conservante sintético, ou seja, quanto mais distante é a curva da linha pontilhada que indica o comportamento aditivo teórico se obtém o efeito de sinergismo (a e b).

Bassolé et al. (2010) observaram forte ação antimicrobiana e a presença de sinergismo na combinação dos compostos linalol/eugenol e mentol/eugenol, constando a eficácia da associação dessas substâncias frente *Escherichia coli*. Avaliou também a associação dos óleos essenciais de *Lippia multiflora* e *Mentha piperita*, observando efeito sinérgico frente à bactéria *Escherichia coli* e efeito aditivo frente à *Staphylococcus aureus*.

As bactérias mais sensíveis a combinação do óleo essencial de cravo e metilparabeno foram as Gram-negativas. A ação do óleo sobre essas bactérias pode ter causado o rompimento e degeneração da parede celular possuidora de lipopolissacarídeos, devido o óleo essencial ser uma substância lipofílica tendo o poder de se acumular e penetrar na membrana (DORMAN; DEANS, 2000).

O potencial antimicrobiano também pode estar relacionado com a atividade do eugenol, danificando as propriedades das proteínas da membrana celular bacteriana, quando

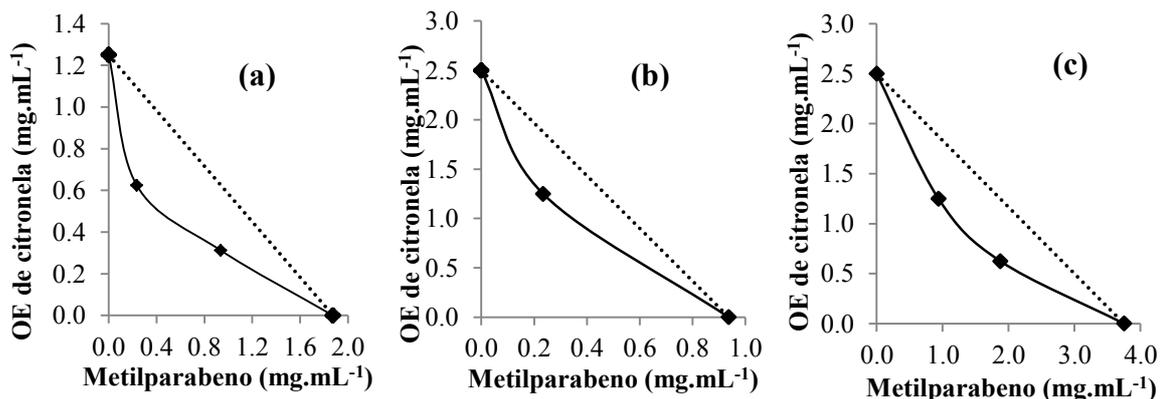
associado ao conservante sintético metilparabeno. Altas concentrações de eugenol pode promover a inibição da ATPase, responsável pela geração de energia da célula, promovendo a morte celular da bactéria (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Os parabenos possuem maior potencial antimicrobiano quando não ocorre a sua ionização. A forma não ionizada desses compostos lipofílicos facilita a penetração na membrana celular da bactéria, sobre os quais é realizado o potencial de inibição do conservante (DEVI et al., 2010; SONI<sup>5</sup>; CARABIN; BURDOCK, 2005 apud MELO, 2012b).

Contudo, estudos indicam que a utilização dos parabenos associados a outras substâncias conservantes proporcionam um excelente efeito sinérgico (SONI<sup>4</sup>; CARABIN; BURDOCK, 2005 apud MELO, 2012b).

Na associação do óleo essencial de citronela e conservante sintético metilparabeno não foi evidenciado efeito sinérgico frente a nenhuma das bactérias. O menor FICI na associação dessas substâncias foi para a bactéria *Bacillus cereus* (0,62), seguido por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com FICI de 0,75. Não foi realizado associação frente à bactéria *Salmonella typhi*, devido a sua resistência mesmo na maior concentração de óleo essencial de citronela testada (5,0 mg.mL<sup>-1</sup>).

Os isobogramas obtidos a partir da associação do óleo essencial de citronela e o conservante metilparabeno estão representados na Figura 12.



**Figura 12-** Isobogramas obtidos através da associação entre o óleo essencial de citronela e o conservante sintético metilparabeno contra as bactérias (a) *Bacillus cereus*; (b) *Escherichia coli*; (c) *Staphylococcus aureus*. A linha pontilhada indica o comportamento aditivo teórico.

<sup>5</sup> SONI, M. G.; CARABIN, I. G.; BURDOCK, G. A. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 7, p. 985-1015, 2005.

A partir da Figura 12 pode-se observar que a curva não se distancia muito da linha pontilhada, caracterizando um efeito aditivo da associação (óleo essencial de citronela x metilparabeno) frente as três bactérias.

A associação deste óleo essencial com metilparabeno, diferente do óleo essencial de cravo, não se mostrou satisfatória. Desta forma, a eficácia de cada óleo essencial pode variar de acordo com o pH da solução e principalmente nas concentrações e tipo de componentes ativos presentes (BURT, 2004).

Contudo, o mecanismo de ação antimicrobiana dos parabenos é ainda bastante complexo. Alguns estudos relatam que os parabenos também apresentam ação sobre a síntese de DNA e RNA, sobre algumas enzimas essenciais ou, ainda, sobre os mecanismos de transporte pelas membranas (FERNANDES; SAVINO; AMARANTE, 2013).

Na associação do óleo essencial de cravo e conservante metabissulfito de sódio, foi evidenciado efeito aditivo frente as quatro bactérias avaliadas, *Bacillus cereus* (FICI - 0,75), *Escherichia coli* (FICI - 0,75), *Staphylococcus aureus* (FICI - 0,75) e *Salmonella typhi* (FICI - 0,62). O efeito de cada interação entre essas substâncias pode ser observado nos isobogramas apresentados na Figura 13.

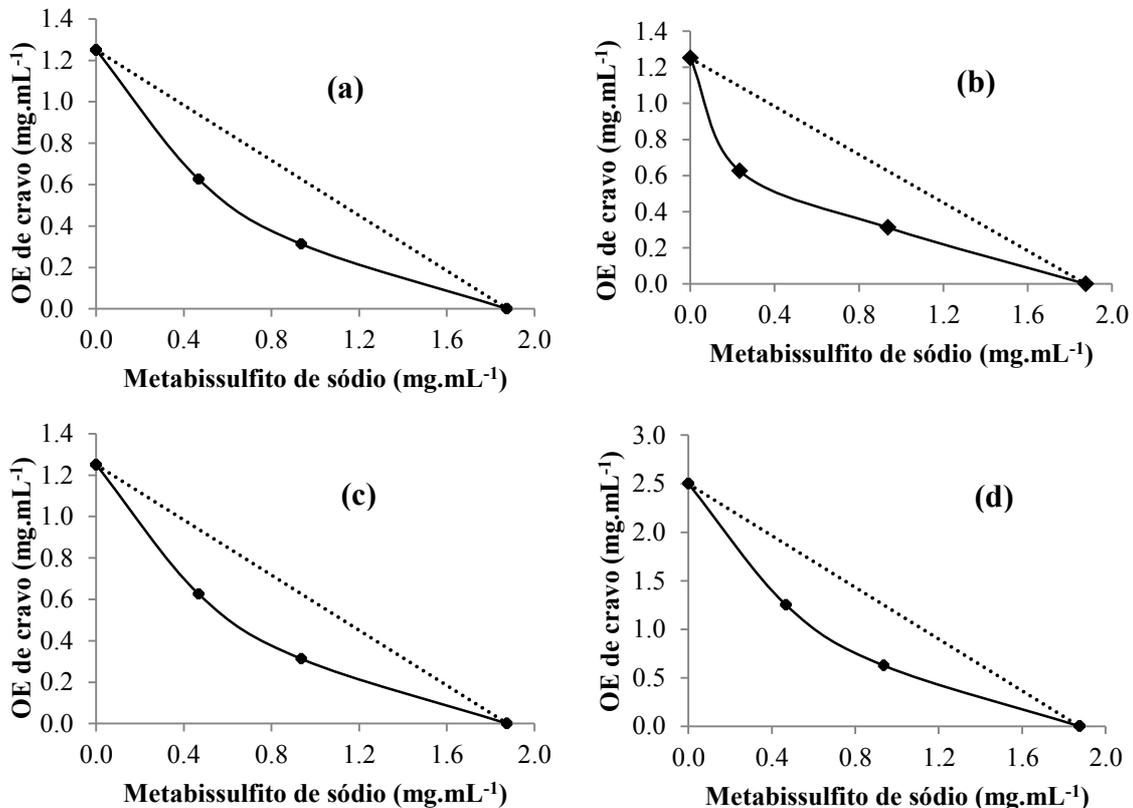


Figura 13- Isobogramas obtidos através da associação entre o óleo essencial de cravo e o conservante sintético metabissulfito de sódio contra as bactérias (a) *Bacillus cereus*; (b) *Salmonella typhi*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Staphylococcus aureus*. A linha pontilhada indica o comportamento aditivo teórico.

A partir da associação do óleo essencial de cravo com o conservante metabissulfito de sódio observou-se inibição das bactérias em algumas concentrações quando associados (APÊNDICE A), no entanto não ocorreu grandes variações nos valores de FICI entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, diferente dos resultados obtidos na associação com o conservante metilparabeno.

No estudo realizado por Bostan et al. (2013) evidenciaram a ação bacteriostática e bactericida da mistura de antibióticos com o conservante metabissulfito de sódio, obtendo resultados satisfatórios na inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Um fator que pode ter influenciado na ação antimicrobiana desse conservante frente às cepas avaliadas é o pH, que se estava próximo da neutralidade. A redução do pH, promove a liberação de dióxido de enxofre molecular ( $\text{SO}_2$ ), que também influencia no potencial contra micro-organismos (MACHADO; TOLEDO, 2006).

O conservante metabissulfito de sódio contém em sua composição aproximadamente 67,4 % de dióxido de enxofre ativo. Quando esse conteúdo de  $\text{SO}_2$  presente é dissolvido em água, ocorre a formação de alguns íons, tais como, o íon bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) e íon sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Esses íons podem reagir com substâncias como aldeídos, proteínas, cetonas, para formar compostos adicionais, como o ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ). Desta forma, esse composto formado apresenta características com potencial sobre a membrana celular da bactéria e uma consequente inibição do micro-organismo. Os alvos mais prováveis da inibição por sulfitos incluem a ruptura da membrana citoplasmática, inativação da replicação do DNA, inativação de enzimas vinculadas à membrana, entre outros (MACHADO; TOLEDO, 2006; FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011).

Portanto, a avaliação de agentes antimicrobianos utilizados isoladamente ou em associação é muito importante, devido à resistência e riscos que as bactérias patogênicas podem causar à saúde pública, quando presentes em produtos cosméticos, farmacêuticos e, principalmente, alimentícios (BARBOSA, 2011; PEREIRA et al., 2014).

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que o óleo vegetal extraído das sementes de romã obteve um bom rendimento na extração, apresentando atividade antioxidante na inibição do radical DPPH, no entanto não se mostrou eficiente no potencial antimicrobiano frente a nenhuma das bactérias avaliadas.

Dentre os óleos essenciais, o óleo de eucalipto não apresentou potencial mesmo nas maiores concentrações testadas. Os demais óleos essenciais apresentaram capacidade de inibição ao radical DPPH ou atividade contra algumas das bactérias avaliadas. O óleo essencial de cravo mostrou-se o mais eficaz apresentando os melhores resultados quando isolado, como também, foi evidenciado a presença de sinergismo quando associado à metilparabeno reduzindo a concentração deste conservante sintético com baixas concentrações do óleo essencial frente às bactérias Gram-negativas avaliadas. A partir disso, pode ser considerado um produto natural com propriedades essenciais para conservação de produtos.

Contudo, estudos complementares *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para verificar uma possível utilização destes produtos naturais em associação, de forma que se obtenha uma redução da concentração dos conservantes sintéticos em produtos alimentícios e cosméticos.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S. A.; ABOOD, N. H.; AL-JANABI, A. A. Antimicrobial Effect of Pomegranate Peel Extract on Some Pathogenic Microorganisms. **Engineering and Technology Journal**, v. 31, n.3, 2012.
- ALBUQUERQUE, L. F. **Estudo da oxidação do metabissulfito de sódio contido no efluente da carcinicultura**. 2005, 85 f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n.2, p. 399-408, 2012.
- ARUOMA, O. I.; SPENCER, J. P. E.; WARREN, D.; JENNER, P.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B. Characterization of food antioxidants, illustrated using commercial garlic and ginger preparations. **Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 149-156, 1997.
- BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BARBOSA, D. B. M. **Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitti (Citronela) com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus***. 2011. 92 f. Tese de Doutorado em Odontologia - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- BARBOSA, M. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro” da *Punica granatum* Linn. frente à *Enterococcus faecalis* isolados Clinicamente**. 2010. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Odontologia - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.
- BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R. C.; DICKO, M. H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multi-flora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v.15, p. 7825–7839, 2010.
- BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; JUNIOR, A. F. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BORDOLOI, D. N. Citronella oil industry in North east India. **Cultivation and utilization of aromatic plants**. Regional Research laboratory, India, p. 318-324, 1982.

BOSTAN, H.; TOMAK, Y.; KARAOGLUC, A. A.; ERDIVANLI, B.; HANCI, V. In vitro evaluation of antimicrobial features of vasopressors. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 64, p. 84-88, 2013.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BHUIYAN, M. N. I; BEGUM, J; NANDI, N. C; AKTER, F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Plant Science**, Bangladesh, v. 11, p.451-454, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - CNNPA nº 12 de 1978**. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78.pdf)>. Acesso em: 20 Abr. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC nº 162 de 15 de Setembro de 2001**.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC nº 5 de 15 de Janeiro de 2007**. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7c76c90045a940fd9b679fa9166895f7/RDC\\_5\\_2007\\_anexo.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7c76c90045a940fd9b679fa9166895f7/RDC_5_2007_anexo.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 11 Abr. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada- **RDC nº 8, de 06 de março de 2013**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1cac3e004edacb17a9e8ab8a610f4177/RDC+N+08++2013+Aditivos+frutas+e+vegetais.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 11 Abr. 2015.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais. **Boletim técnico Fepagro**, Rio Grande do Sul, n.11, 2003. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/gramineas.pdf>>. Acesso em: 03. Abr. 2015.

CARREIRA, F. C.; **Determinação de parabenos em antitranspirantes empregando voltametria sob eletrodo de diamante e cromatografia líquida de alta eficiência**. 2008, 105 f. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CAVANAGH H. M. A.; WILKINSON J. M. Biological activities of lavender essential oil. **Phytother Research**, v. 16, p. 301-308, 2002.

CERT, A.; MOREDA, M. C.; PÉREZ-CAMINO. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 131-148, 2000.

COUTINHO, V.; BEZERRA, D. A. C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I. J. F. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos**, v. 6, p. 77-85, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, p. 686-689, 1984.

CORRÊA, A. P. A.; SILVA, S. D. S.; D'AVILA, R.; KROLOW, A. C. R.; ZAMBIAZI, R. C. **Perfil de ácidos graxos do óleo de semente de abóboras crioulas (*Cucurbita máxima L.*)**. Congresso Brasileiro de Processamento de frutas e hortaliças, Ilhéus, 2013. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/93562/1/cd229-387-1-RV.pdf>> .Acesso em: 02. Abr. 2015.

COSTA, C. M. G. R.; SANTOS, M. S.; BARROS, H. M. M.; AGRA, P. F. M.; FARIAS, M. A. A. Óleo essencial de citronela no controle da bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora*. **Tecnologia e Ciências Agropecuárias**, João Pessoa, v. 2, p. 11-14, 2008.

COSTA, A. R. T.; AMARAL, M. F. Z. J.; MARTINS, P. M.; PAULA, J. A. M.; FIUZA, T. S.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.13, p.240-245, 2011.

CUNNIFF, P. Official Methods of Analysis of AOAC internacional. **AOAC Internacional**, v.1, 1998.

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANGA, S. S.; CHOI, K. B.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p.1161-1168, 2002.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. **Approved Standard M7-A9**, v. 32, n. 2, 9º ed, 2012.

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

DI MAMBRO, V. M.; MARQUELE, F. D; FONSECA, M. J. V. Avaliação *in vitro* da ação antioxidante em formulações antienvhecimento. **Cosmetic & Toiletries**, v.17, n.4, p.74-78, 2005.

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.

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

ENDO, E. H. **Efeito antifúngico de extrato bruto e frações de *Punica granatum* contra *Candida albicans* e sinergismo com fluconazol**. 2007, 57 f. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

ESTANISLAU, A. A.; BARROS, F. A. S.; PENÃ, A. P.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognesia**, v. 12, n. 2, p. 95-100, 2001.

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**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2011.

FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G. Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 890-893, 2013.

FERREIRA, A. F. P. V.; **Desenvolvimento farmacêutico e validação do método analítico de uma suspensão contendo paracetamol**. 2010, 110 f. Dissertação de mestrado - Universidade de Coimbra, Portugal, 2010.

FIGUEIREDO, A. C; PEDRO, L. .G; BARROSO, J. G; TRINDADE, H.; SANCHES, João; OLIVEIRA, Carlos; CORREIA, Miguel. **Óleos essenciais de espécie de eucalyptus**. Tecnologia agroalimentar, Lisboa, 2011. Disponível em: < [http://cbv.fc.ul.pt/Agrotec\\_8.pdf](http://cbv.fc.ul.pt/Agrotec_8.pdf)>. Acesso em: 05 Abr. 2015.

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.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-24, 2012.

HONORATO, T. C.; BATISTA, E.; NASCIMENTO, K.. D. O; PIRES, T. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 01 – 11, 2013.

HOUGHTON P. J.; HOWES, M. J.; LEE C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal Ethnopharmacol**, v. 110, p. 391-400, 2007.

HUI, Y. H. Oleoresins and essential oils. **Baylei's Industrial oil and Fat products**. New York, cap. 6, p. 145-153, 1996.

JARDINI, F. A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) – Participação das frações de ácidos fenólicos nos processos de inibição da oxidação**. 2005. 129 f. Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 137-147, 2007.

KUMAR, A.; SHARMA, P.; KUMARI, P.a; KALAL, B. L. Exploration of antimicrobial and antioxidant potential of newly synthesized 2,3-disubstituted-quinazoline-4(3H)-ones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 4353-4357, 2011.

LANSKY, E. P.; NEWMAN R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, p 1-30, 2006.

LEWIS, R. J. W.; DICKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSER, M. E. Comparison of Estest, chequerboard 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.

MACHADO, R. M.; TOLEDO, M, C. Sulfitos em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265-275, 2006.

MACHADO, T. F; BORGES, M. F; BRUNO, L. M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Revista Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 1 ed. p.10, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. **Microbiologia de Brock**, 12º ed. Artmed, 2010

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MALINOWSKI, L. R. L. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *Eucalyptus globulus* labill. subespécie *bicostata* (maiden et al.) j. b. kirkpat., myrtaceae.** 2010, 119 f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MARQUES, C. A. importância econômica da família lauraceae Lindl. **Revista floresta e ambiente**, Viçosa, v. 8, n.1, p. 195-206, 2001.

MARTIN, J. G. P. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais.** 2011. 100 f. Dissertação de Mestrado em Ciências - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MATTOS S. H; CHAVES C. M. C; INNECCO R; CRUZ G. F. Estudos sobre a época de corte e espaçamento de alecrim-pimenta. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.18, p. 996-997, 2000.

MELO, I. L. P. **Avaliação em ratos do efeito do óleo de sementes de romã (*Punica granatum* L.) sobre o perfil lipídico tecidual e sua influência sobre parâmetros bioquímicos em processos oxidativos.** 2012. 169 f. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012a.

MELO, L. de P. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análises de antimicrobianos em amostras complexas.** 2012, 190 f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012b.

MELO, I. L. P.; CARVALHO, E. B. T.; MANCINI FILHO, J. Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum* L.): A Source of Punicic Acid (Conjugated  $\alpha$ -Linolenic Acid). **Journal of Human Nutrition Food Science**, São Paulo, v. 1, p. 1024, 2014.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MOHLER, B. C. **Avaliação das características de secagem dos grãos de soja**. 2010, 35 f. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

NASCIMENTO, K. O.; SILVA, A. A.; FERREIRA, M. V. S.; BATISTA, E.; AUGUSTA, I. M.; RODRIGUES, N. R.; PIRES, T.; BARBOSA, M. I. M. J. Determinação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum* l.) pelos métodos de DPPH e FRAP. **Higiene Alimentar**, v. 27, n. 218/219, p. 1499-1502, 2013.

NOGUEIRA, L. G. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteriaspp.* e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori***. 2012. 107 f. Tese de Doutorado em Ciências farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. Atheneu, São Paulo, 3<sup>o</sup> ed, 2008.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. São Paulo, p.301-302, 2008.

OLIVEIRA, A. M. C. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum spp.*** 2011. 82 f. Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, p.102-103, 2007.

PEREIRA, A. A.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 2022-2028, 2014.

POVH, J. A. **Reguladores Vegetais e Bioestimulantes no desenvolvimento de *Salvia officinalis* L.: avaliações fisiológicas, bioquímicas e fitoquímicas**. 2008. 115 f. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008. Disponível em: [http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064025P2/2008/povh\\_ja\\_dr\\_botib.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064025P2/2008/povh_ja_dr_botib.pdf) <. Acesso em: 16 Abr. 2015.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. 2012, 102 f. Dissertação de mestrado em Biologia geral e aplicada - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.

RAINA, V. K.; SRIVASTAVA, S. K.; AGGARWAL K. K.; SYAMASUNDAR K. V.; SUSHIL K. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman. **Flavour Fragrance Journal**, Índia, p. 334-336, 2001.

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

RABÊLO, W. F. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010, 75 f. Dissertação de mestrado em Química analítica - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2010.

REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. 2010, 106 f. Tese de Doutorado em Química Orgânica - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

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**. 2011, 103 f. Dissertação de Pós-graduação em ciência de alimentos - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular do eucalipto *Eucalyptus globulus* Labill – Myrtaceae. **Saúde e ambiente em revista**. Duque de Caixias, v. 2, n. 2, p. 23-34, 2007.

ROCHA, L. Q. **Interferência do óleo essencial de folhas do Quimiotipo II de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown n atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente**. 2012, 125 f. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RODRIGUES, T. T. **Revisão bibliográfica da utilização de bactericidas como conservantes alimentícios na última década.** 2010. 52 f. Monografia de conclusão de curso de Bacharel em Farmácia, Universidade Comunitária da região de Chapecó, Chapecó - SC, 2010.

RUFINO, M. do S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. de.; MORAIS, S. M. de.; SAMPAIO, C. de G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico online.** ISSN 1679-6535, Fortaleza – CE, 2007a.

\_\_\_\_\_. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>•+</sup>. **Comunicado Técnico online.** ISSN 1679-6535, Fortaleza - CE, 2007b.

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.

SANGUN, M. K.; AYDIN, E.; TIMUR, M.; KARADENIZ, H.; CALISKAN, M.; OZKAN, A. Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay, Turkey. **Journal of Environmental Biology**, v. 28, n.4, p. 731-733, 2007.

SANTOS, E. H. B. et al. **Composição físico-química dos frutos da romã (*Punica granatum* L).** Coordenação de Tecnologia em Alimentos, Petrolina, 2010. Disponível em: <<http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/Rom%C3%A3.pdf>>. Acesso em 17 Abr. 2014.

SCHERER, R; WAGNER, R; DUARTE, M. C. T; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.11, p.442-449, 2009.

SIMI, M.; KUNDAKOVI, T.; KOVACEVI, N. Preliminary assay on the anti-oxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, n. 6, p. 613-616, 2003.

SILVA, M. A. R et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Punica granatum* Linn. Em linhagens de *Staphylococcus aureus* de origem bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.209-212, 2008.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Revista Ciências Agrárias**, Londrina, p. 669-682, 2010.

SILVA, N. K.; MANSANO, M.; NOGUEIRA, R. I.; FREITAS, S. P. **Obtenção e caracterização de óleo de semente de romã (*Punica granatum*) por prensagem a frio**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/946310/1/2012251.pdf>>. Acesso em: 17 Abr. 2015.

SILVEIRA, S. M.; CUNHA, A.; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VERRUCK, S.; KROHN, M.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71(3), p. 471-480, 2012.

SOUZA, A. A. et al. Alimentos orgânicos e saúde humana: estudo sobre as controvérsias. **Revista Panam Salud Publica**, p. 513-514, 2012a.

SOUZA, V. R. **Extração e caracterização de óleo de sementes de frutos**. 2012, 52 f. Dissertação de mestrado em Tecnologia de alimentos, Universidade do Algarve, 2012b.

SOUZA, S. P. ; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, J.; MALLET, A. C. T.; NELSON, D. L. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, n.4, p.456-466, 2011.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as perspectivas da indústria alimentícia. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, p.38-42, 2003.

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

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.1289–1296, 2004.

STAMFORD, T. L.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* ssp. Isolados de leite *in natura* . **Ciência e Tecnologia de alimentos**, Campinas, v. 26, p. 41-45, 2006.

TAJKARIMI, M.M; IBRAHIM, S. A; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food control**, v. 21, p. 1199-1218, 2010.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Artmed, Porto Alegre, 3 ed, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre, 6º ed, Artmed, 2003.

TOSCAN, C. M; **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. 2010, 69 f. Dissertação de mestrado em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxia do Sul, 2010.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-2478, 2005.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of Mentha piperita oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v. 22, p. 1707-1714, 2011.

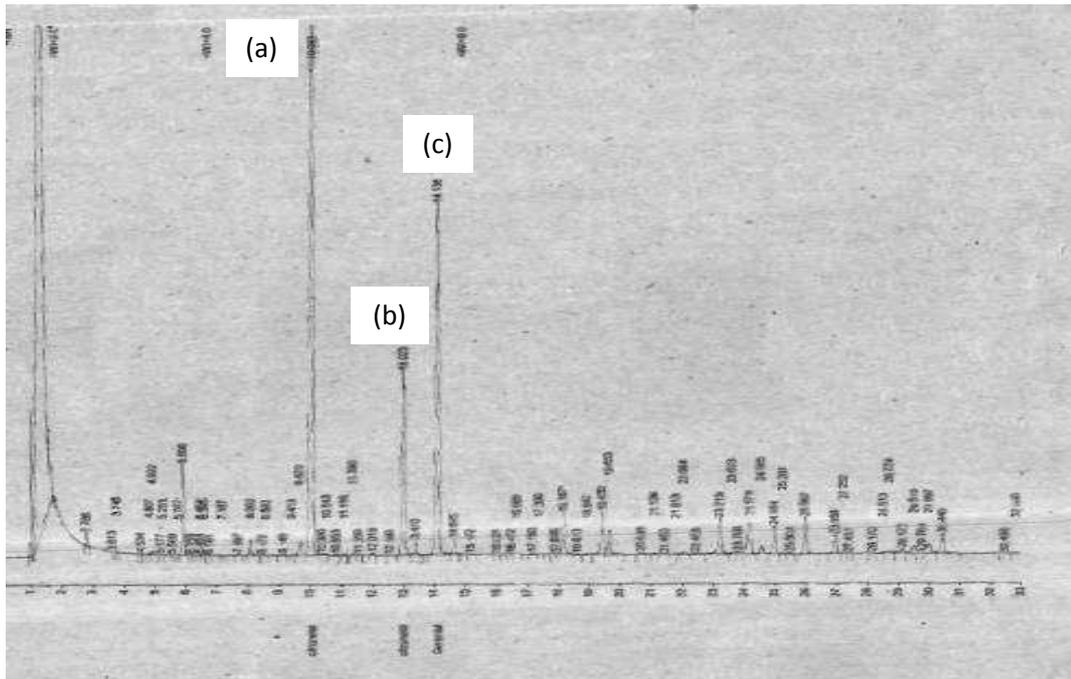
VENSKUTONIS P. R.; DAPKEVICIUS A.; BARANAUSKIENE M. Composition of the essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from Lithuania. **Journal Essential Oil**, v. 9, p.107–110, 1997.

VEDANA, M. I. S. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. 2008, 88 f. Dissertação de mestrado em Tecnologia em Alimentos - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

VILELA, G. R. **Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre especies produtoras de aflatoxinas**. 2007, f. 63. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

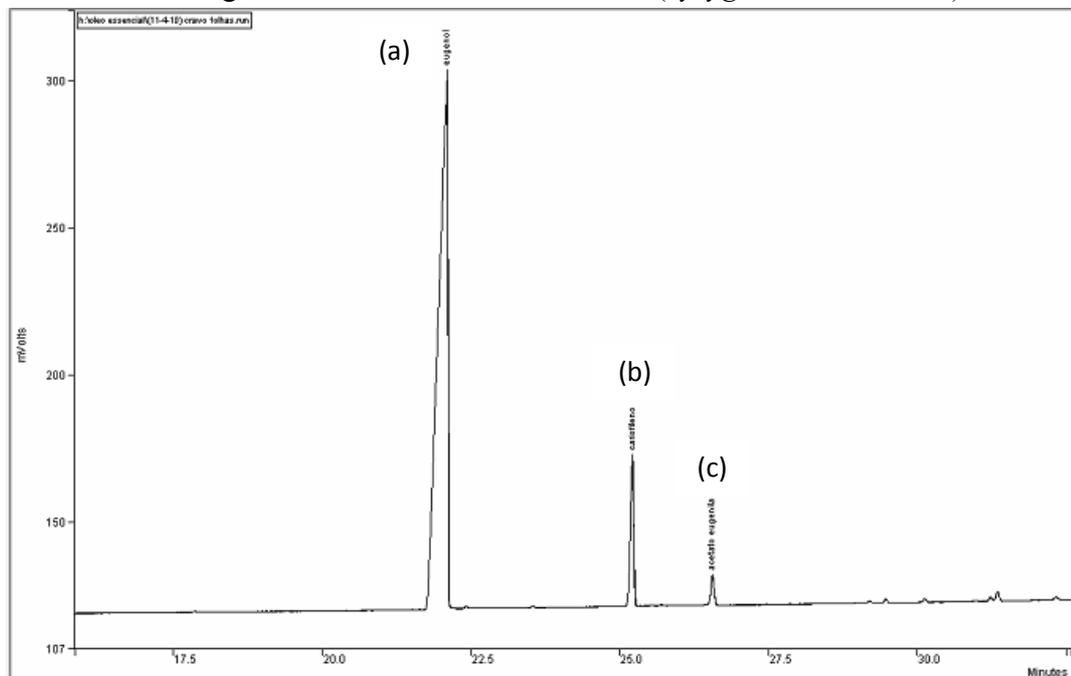
VITTI, A. M. S; BRITO, J.O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**. Universidade de São Paulo, São Paulo, n. 17, p. 1-26, 2003.

ANEXO A – Cromatograma do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*).



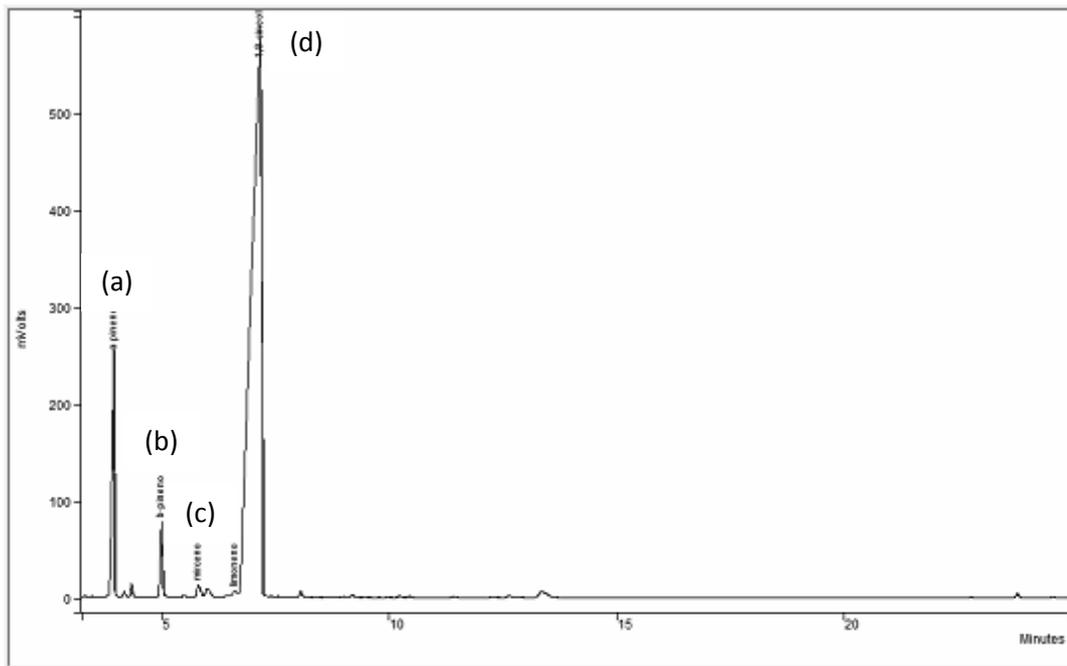
Principais compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução: (a) citronelal - 43,24%; (b) citrionelol - 9,56%; (c) geraniol - 19,98%.

ANEXO B – Cromatograma do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*)



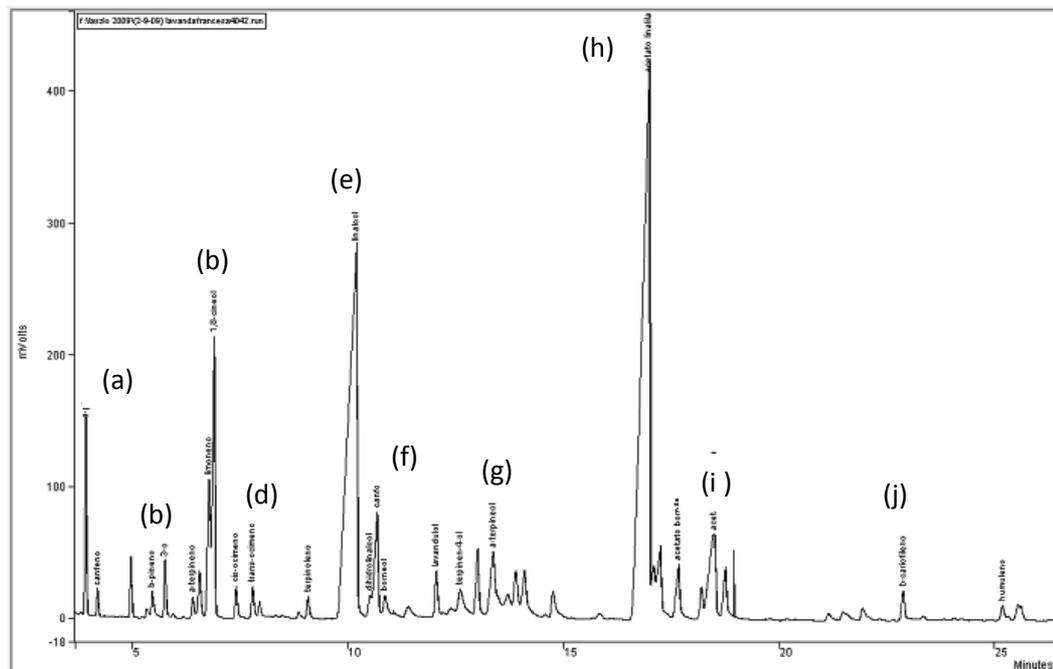
Principais compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução: (a) eugenol- 88,5 %; (b) cariofileno- 8,6 %; (c) acetato de eugenila – 1,7 %.

ANEXO C – Cromatograma do óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*)

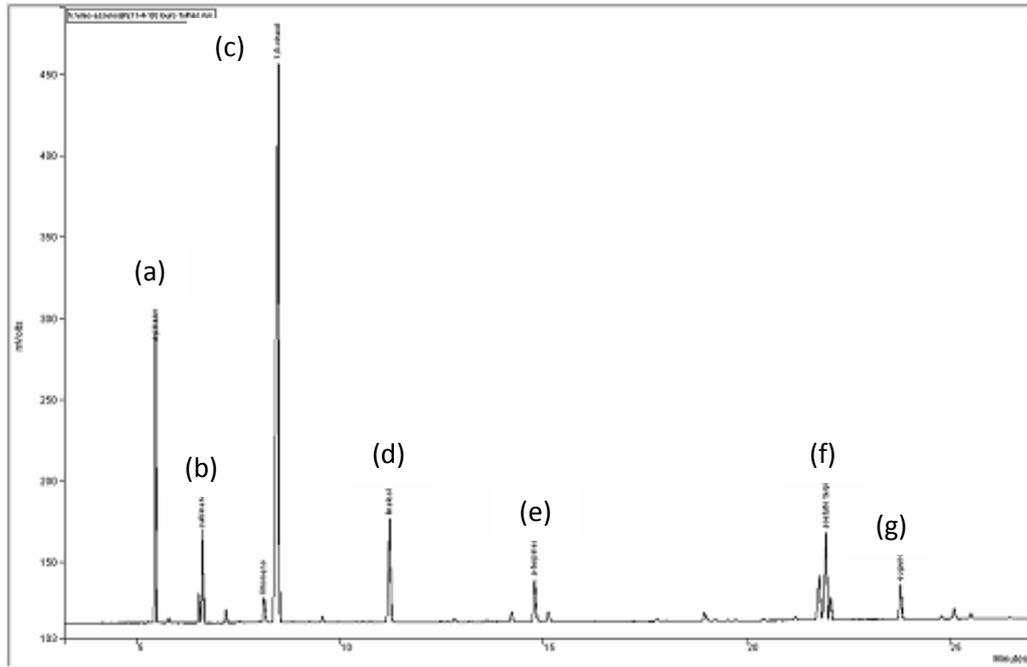


Principais compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução: (a)  $\alpha$ -pineno – 8,3%; (b)  $\beta$ -pineno – 2,4%; (c) mirceno – 0,7 %; (d) 1,8-cineol – 85,4 %.

ANEXO D – Cromatograma do óleo essencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*)



Principais compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução: (a)  $\alpha$ -pineno – 2,1%; (b)  $\beta$ -pineno – 0,5%; (c) 1,8-cineol – 4,8%; (d) cis-ocimeno e trans-ocimeno - 0,5%; (e) linalol – 22,5%; (f) cânfora – 2,6%; (g)  $\alpha$ -terpineol – 2,9%; (h) acetato de linalila - 30,2%; (i) acetato de lavandulila – 4,2%; (j)  $\beta$ -cariofileno – 0,7%.

ANEXO E – Cromatograma do óleo essencial de louro (*Laurus nobilis*).

Principais compostos identificados através da técnica de Cromatografia Gasosa de alta Resolução: (a)  $\alpha$ -pineno - 12,9%; (b) sabineno - 4,0 %; (c) 1,8-cineol - 50,4%; (d) linalol - 7,6%; (e)  $\alpha$ -terpineol - 3,1%; (f) acetato de terpinila - 6,5%; (g) eugenol - 2,5%.

APÊNDICE A – Quadros representando o teste de “checkerboard” para as associações do óleo e conservante sintético

		Metilparabeno (mg/mL)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
→	A	<u>7,50</u> 0,00	<u>7,50</u> 0,004	<u>7,50</u> 0,009	<u>7,50</u> 0,019	<u>7,50</u> 0,039	<u>7,50</u> 0,078	<u>7,50</u> 0,156	<u>7,50</u> 0,312	<u>7,50</u> 0,625	<u>7,50</u> 1,25	<u>7,50</u> 2,50	<u>7,50</u> 5,00
	B	<u>3,75</u> 0,00	<u>3,75</u> 0,004	<u>3,75</u> 0,009	<u>3,75</u> 0,019	<u>3,75</u> 0,039	<u>3,75</u> 0,078	<u>3,75</u> 0,156	<u>3,75</u> 0,312	<u>3,75</u> 0,625	<u>3,75</u> 1,25	<u>3,75</u> 2,50	<u>3,75</u> 5,00
	C	<u>1,875</u> 0,00	<u>1,875</u> 0,004	<u>1,875</u> 0,009	<u>1,875</u> 0,019	<u>1,875</u> 0,039	<u>1,875</u> 0,078	<u>1,875</u> 0,156	<u>1,875</u> 0,312	<u>1,875</u> 0,625	<u>1,875</u> 1,25	<u>1,875</u> 2,50	<u>1,875</u> 5,00
	D	<u>0,937</u> 0,00	<u>0,937</u> 0,004	<u>0,937</u> 0,009	<u>0,937</u> 0,019	<u>0,937</u> 0,039	<u>0,937</u> 0,078	<u>0,937</u> 0,156	<u>0,937</u> 0,312	<u>0,937</u> 0,625	<u>0,937</u> 1,25	<u>0,937</u> 2,50	<u>0,937</u> 5,00
	E	<u>0,468</u> 0,00	<u>0,468</u> 0,004	<u>0,468</u> 0,009	<u>0,468</u> 0,019	<u>0,468</u> 0,039	<u>0,468</u> 0,078	<u>0,468</u> 0,156	<u>0,468</u> 0,312	<u>0,468</u> 0,625	<u>0,468</u> 1,25	<u>0,468</u> 2,50	<u>0,468</u> 5,00
	F	<u>0,234</u> 0,00	<u>0,234</u> 0,004	<u>0,234</u> 0,009	<u>0,234</u> 0,019	<u>0,234</u> 0,039	<u>0,234</u> 0,078	<u>0,234</u> 0,156	<u>0,234</u> 0,312	<u>0,234</u> 0,625	<u>0,234</u> 1,25	<u>0,234</u> 2,50	<u>0,234</u> 5,00
	G	<u>0,117</u> 0,00	<u>0,117</u> 0,004	<u>0,117</u> 0,009	<u>0,117</u> 0,019	<u>0,117</u> 0,039	<u>0,117</u> 0,078	<u>0,117</u> 0,156	<u>0,117</u> 0,312	<u>0,117</u> 0,625	<u>0,117</u> 1,25	<u>0,117</u> 2,50	<u>0,117</u> 5,00
	H	<u>0,00</u> 0,00	<u>0,00</u> 0,004	<u>0,00</u> 0,009	<u>0,00</u> 0,019	<u>0,00</u> 0,039	<u>0,00</u> 0,078	<u>0,00</u> 0,156	<u>0,00</u> 0,312	<u>0,00</u> 0,625	<u>0,00</u> 1,25	<u>0,00</u> 2,50	<u>0,00</u> 5,00
		Óleo essencial de cravo (mg/mL)											
												↑	

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o óleo essencial de cravo e do conservante metilparabeno contra *Salmonella typhi*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

		Metilparabeno (mg/mL)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
→	A	<u>7,50</u> 0,00	<u>7,50</u> 0,004	<u>7,50</u> 0,009	<u>7,50</u> 0,019	<u>7,50</u> 0,039	<u>7,50</u> 0,078	<u>7,50</u> 0,156	<u>7,50</u> 0,312	<u>7,50</u> 0,625	<u>7,50</u> 1,25	<u>7,50</u> 2,50	<u>7,50</u> 5,00
	B	<u>3,75</u> 0,00	<u>3,75</u> 0,004	<u>3,75</u> 0,009	<u>3,75</u> 0,019	<u>3,75</u> 0,039	<u>3,75</u> 0,078	<u>3,75</u> 0,156	<u>3,75</u> 0,312	<u>3,75</u> 0,625	<u>3,75</u> 1,25	<u>3,75</u> 2,50	<u>3,75</u> 5,00
	C	<u>1,875</u> 0,00	<u>1,875</u> 0,004	<u>1,875</u> 0,009	<u>1,875</u> 0,019	<u>1,875</u> 0,039	<u>1,875</u> 0,078	<u>1,875</u> 0,156	<u>1,875</u> 0,312	<u>1,875</u> 0,625	<u>1,875</u> 1,25	<u>1,875</u> 2,50	<u>1,875</u> 5,00
	D	<u>0,937</u> 0,00	<u>0,937</u> 0,004	<u>0,937</u> 0,009	<u>0,937</u> 0,019	<u>0,937</u> 0,039	<u>0,937</u> 0,078	<u>0,937</u> 0,156	<u>0,937</u> 0,312	<u>0,937</u> 0,625	<u>0,937</u> 1,25	<u>0,937</u> 2,50	<u>0,937</u> 5,00
	E	<u>0,468</u> 0,00	<u>0,468</u> 0,004	<u>0,468</u> 0,009	<u>0,468</u> 0,019	<u>0,468</u> 0,039	<u>0,468</u> 0,078	<u>0,468</u> 0,156	<u>0,468</u> 0,312	<u>0,468</u> 0,625	<u>0,468</u> 1,25	<u>0,468</u> 2,50	<u>0,468</u> 5,00
	F	<u>0,234</u> 0,00	<u>0,234</u> 0,004	<u>0,234</u> 0,009	<u>0,234</u> 0,019	<u>0,234</u> 0,039	<u>0,234</u> 0,078	<u>0,234</u> 0,156	<u>0,234</u> 0,312	<u>0,234</u> 0,625	<u>0,234</u> 1,25	<u>0,234</u> 2,50	<u>0,234</u> 5,00
	G	<u>0,117</u> 0,00	<u>0,117</u> 0,004	<u>0,117</u> 0,009	<u>0,117</u> 0,019	<u>0,117</u> 0,039	<u>0,117</u> 0,078	<u>0,117</u> 0,156	<u>0,117</u> 0,312	<u>0,117</u> 0,625	<u>0,117</u> 1,25	<u>0,117</u> 2,50	<u>0,117</u> 5,00
	H	<u>0,00</u> 0,00	<u>0,00</u> 0,004	<u>0,00</u> 0,009	<u>0,00</u> 0,019	<u>0,00</u> 0,039	<u>0,00</u> 0,078	<u>0,00</u> 0,156	<u>0,00</u> 0,312	<u>0,00</u> 0,625	<u>0,00</u> 1,25	<u>0,00</u> 2,50	<u>0,00</u> 5,00
		Óleo essencial de cravo (mg/mL)											
												↑	

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o óleo essencial de cravo e do conservante metilparabeno contra *Staphylococcus aureus*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

		Metilparabeno (mg/mL)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	<u>7,50</u> <b>0,00</b>	<u>7,50</u> <b>0,004</b>	<u>7,50</u> <b>0,009</b>	<u>7,50</u> <b>0,019</b>	<u>7,50</u> <b>0,039</b>	<u>7,50</u> <b>0,078</b>	<u>7,50</u> <b>0,156</b>	<u>7,50</u> <b>0,312</b>	<u>7,50</u> <b>0,625</b>	<u>7,50</u> <b>1,25</b>	<u>7,50</u> <b>2,50</b>	<u>7,50</u> <b>5,00</b>
	B	<u>3,75</u> <b>0,00</b>	<u>3,75</u> <b>0,004</b>	<u>3,75</u> <b>0,009</b>	<u>3,75</u> <b>0,019</b>	<u>3,75</u> <b>0,039</b>	<u>3,75</u> <b>0,078</b>	<u>3,75</u> <b>0,156</b>	<u>3,75</u> <b>0,312</b>	<u>3,75</u> <b>0,625</b>	<u>3,75</u> <b>1,25</b>	<u>3,75</u> <b>2,50</b>	<u>3,75</u> <b>5,00</b>
	C	<u>1,875</u> <b>0,00</b>	<u>1,875</u> <b>0,004</b>	<u>1,875</u> <b>0,009</b>	<u>1,875</u> <b>0,019</b>	<u>1,875</u> <b>0,039</b>	<u>1,875</u> <b>0,078</b>	<u>1,875</u> <b>0,156</b>	<u>1,875</u> <b>0,312</b>	<u>1,875</u> <b>0,625</b>	<u>1,875</u> <b>1,25</b>	<u>1,875</u> <b>2,50</b>	<u>1,875</u> <b>5,00</b>
→	D	<u>0,937</u> <b>0,00</b>	<u>0,937</u> <b>0,004</b>	<u>0,937</u> <b>0,009</b>	<u>0,937</u> <b>0,019</b>	<u>0,937</u> <b>0,039</b>	<u>0,937</u> <b>0,078</b>	<u>0,937</u> <b>0,156</b>	<u>0,937</u> <b>0,312</b>	<u>0,937</u> <b>0,625</b>	<u>0,937</u> <b>1,25</b>	<u>0,937</u> <b>2,50</b>	<u>0,937</u> <b>5,00</b>
	E	<u>0,468</u> <b>0,00</b>	<u>0,468</u> <b>0,004</b>	<u>0,468</u> <b>0,009</b>	<u>0,468</u> <b>0,019</b>	<u>0,468</u> <b>0,039</b>	<u>0,468</u> <b>0,078</b>	<u>0,468</u> <b>0,156</b>	<u>0,468</u> <b>0,312</b>	<u>0,468</u> <b>0,625</b>	<u>0,468</u> <b>1,25</b>	<u>0,468</u> <b>2,50</b>	<u>0,468</u> <b>5,00</b>
	F	<u>0,234</u> <b>0,00</b>	<u>0,234</u> <b>0,004</b>	<u>0,234</u> <b>0,009</b>	<u>0,234</u> <b>0,019</b>	<u>0,234</u> <b>0,039</b>	<u>0,234</u> <b>0,078</b>	<u>0,234</u> <b>0,156</b>	<u>0,234</u> <b>0,312</b>	<u>0,234</u> <b>0,625</b>	<u>0,234</u> <b>1,25</b>	<u>0,234</u> <b>2,50</b>	<u>0,234</u> <b>5,00</b>
	G	<u>0,117</u> <b>0,00</b>	<u>0,117</u> <b>0,004</b>	<u>0,117</u> <b>0,009</b>	<u>0,117</u> <b>0,019</b>	<u>0,117</u> <b>0,039</b>	<u>0,117</u> <b>0,078</b>	<u>0,117</u> <b>0,156</b>	<u>0,117</u> <b>0,312</b>	<u>0,117</u> <b>0,625</b>	<u>0,117</u> <b>1,25</b>	<u>0,117</u> <b>2,50</b>	<u>0,117</u> <b>5,00</b>
	H	<u>0,00</u> <b>0,00</b>	<u>0,00</u> <b>0,004</b>	<u>0,00</u> <b>0,009</b>	<u>0,00</u> <b>0,019</b>	<u>0,00</u> <b>0,039</b>	<u>0,00</u> <b>0,078</b>	<u>0,00</u> <b>0,156</b>	<u>0,00</u> <b>0,312</b>	<u>0,00</u> <b>0,625</b>	<u>0,00</u> <b>1,25</b>	<u>0,00</u> <b>2,50</b>	<u>0,00</u> <b>5,00</b>

Óleo essencial de cravo (mg/mL) ↑

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de cravo** e do **conservante metilparabeno** contra *Escherichia coli*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

		Metilparabeno (mg/mL)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	<u>7,50</u> <b>0,00</b>	<u>7,50</u> <b>0,004</b>	<u>7,50</u> <b>0,009</b>	<u>7,50</u> <b>0,019</b>	<u>7,50</u> <b>0,039</b>	<u>7,50</u> <b>0,078</b>	<u>7,50</u> <b>0,156</b>	<u>7,50</u> <b>0,312</b>	<u>7,50</u> <b>0,625</b>	<u>7,50</u> <b>1,25</b>	<u>7,50</u> <b>2,50</b>	<u>7,50</u> <b>5,00</b>
	B	<u>3,75</u> <b>0,00</b>	<u>3,75</u> <b>0,004</b>	<u>3,75</u> <b>0,009</b>	<u>3,75</u> <b>0,019</b>	<u>3,75</u> <b>0,039</b>	<u>3,75</u> <b>0,078</b>	<u>3,75</u> <b>0,156</b>	<u>3,75</u> <b>0,312</b>	<u>3,75</u> <b>0,625</b>	<u>3,75</u> <b>1,25</b>	<u>3,75</u> <b>2,50</b>	<u>3,75</u> <b>5,00</b>
→	C	<u>1,875</u> <b>0,00</b>	<u>1,875</u> <b>0,004</b>	<u>1,875</u> <b>0,009</b>	<u>1,875</u> <b>0,019</b>	<u>1,875</u> <b>0,039</b>	<u>1,875</u> <b>0,078</b>	<u>1,875</u> <b>0,156</b>	<u>1,875</u> <b>0,312</b>	<u>1,875</u> <b>0,625</b>	<u>1,875</u> <b>1,25</b>	<u>1,875</u> <b>2,50</b>	<u>1,875</u> <b>5,00</b>
	D	<u>0,937</u> <b>0,00</b>	<u>0,937</u> <b>0,004</b>	<u>0,937</u> <b>0,009</b>	<u>0,937</u> <b>0,019</b>	<u>0,937</u> <b>0,039</b>	<u>0,937</u> <b>0,078</b>	<u>0,937</u> <b>0,156</b>	<u>0,937</u> <b>0,312</b>	<u>0,937</u> <b>0,625</b>	<u>0,937</u> <b>1,25</b>	<u>0,937</u> <b>2,50</b>	<u>0,937</u> <b>5,00</b>
	E	<u>0,468</u> <b>0,00</b>	<u>0,468</u> <b>0,004</b>	<u>0,468</u> <b>0,009</b>	<u>0,468</u> <b>0,019</b>	<u>0,468</u> <b>0,039</b>	<u>0,468</u> <b>0,078</b>	<u>0,468</u> <b>0,156</b>	<u>0,468</u> <b>0,312</b>	<u>0,468</u> <b>0,625</b>	<u>0,468</u> <b>1,25</b>	<u>0,468</u> <b>2,50</b>	<u>0,468</u> <b>5,00</b>
	F	<u>0,234</u> <b>0,00</b>	<u>0,234</u> <b>0,004</b>	<u>0,234</u> <b>0,009</b>	<u>0,234</u> <b>0,019</b>	<u>0,234</u> <b>0,039</b>	<u>0,234</u> <b>0,078</b>	<u>0,234</u> <b>0,156</b>	<u>0,234</u> <b>0,312</b>	<u>0,23</u> <b>0,62</b>	<u>0,234</u> <b>1,25</b>	<u>0,234</u> <b>2,50</b>	<u>0,234</u> <b>5,00</b>
	G	<u>0,117</u> <b>0,00</b>	<u>0,117</u> <b>0,004</b>	<u>0,117</u> <b>0,009</b>	<u>0,117</u> <b>0,019</b>	<u>0,117</u> <b>0,039</b>	<u>0,117</u> <b>0,078</b>	<u>0,117</u> <b>0,156</b>	<u>0,117</u> <b>0,312</b>	<u>0,117</u> <b>0,625</b>	<u>0,117</u> <b>1,25</b>	<u>0,117</u> <b>2,50</b>	<u>0,117</u> <b>5,00</b>
	H	<u>0,00</u> <b>0,00</b>	<u>0,00</u> <b>0,004</b>	<u>0,00</u> <b>0,009</b>	<u>0,00</u> <b>0,019</b>	<u>0,00</u> <b>0,039</b>	<u>0,00</u> <b>0,078</b>	<u>0,00</u> <b>0,156</b>	<u>0,00</u> <b>0,312</b>	<u>0,00</u> <b>0,625</b>	<u>0,00</u> <b>1,25</b>	<u>0,00</u> <b>2,50</b>	<u>0,00</u> <b>5,00</b>

Óleo essencial de cravo (mg/mL) ↑

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de cravo** e do **conservante metilparabeno** contra *Bacillus cereus*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

Metilparabeno (mg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>7,50</u> 0,00	<u>7,50</u> 0,004	<u>7,50</u> 0,009	<u>7,50</u> 0,019	<u>7,50</u> 0,039	<u>7,50</u> 0,078	<u>7,50</u> 0,156	<u>7,50</u> 0,312	<u>7,50</u> 0,625	<u>7,50</u> 1,25	<u>7,50</u> 2,50	<u>7,50</u> 5,00
B	<u>3,75</u> 0,00	<u>3,75</u> 0,004	<u>3,75</u> 0,009	<u>3,75</u> 0,019	<u>3,75</u> 0,039	<u>3,75</u> 0,078	<u>3,75</u> 0,156	<u>3,75</u> 0,312	<u>3,75</u> 0,625	<u>3,75</u> 1,25	<u>3,75</u> 2,50	<u>3,75</u> 5,00
C	<u>1,875</u> 0,00	<u>1,875</u> 0,004	<u>1,875</u> 0,009	<u>1,875</u> 0,019	<u>1,875</u> 0,039	<u>1,875</u> 0,078	<u>1,875</u> 0,156	<u>1,875</u> 0,312	<u>1,875</u> 0,625	<u>1,875</u> 1,25	<u>1,875</u> 2,50	<u>1,875</u> 5,00
→ D	<u>0,937</u> 0,00	<u>0,937</u> 0,004	<u>0,937</u> 0,009	<u>0,937</u> 0,019	<u>0,937</u> 0,039	<u>0,937</u> 0,078	<u>0,937</u> 0,156	<u>0,937</u> 0,312	<u>0,937</u> 0,625	<u>0,937</u> 1,25	<u>0,937</u> 2,50	<u>0,937</u> 5,00
E	<u>0,468</u> 0,00	<u>0,468</u> 0,004	<u>0,468</u> 0,009	<u>0,468</u> 0,019	<u>0,468</u> 0,039	<u>0,468</u> 0,078	<u>0,468</u> 0,156	<u>0,468</u> 0,312	<u>0,468</u> 0,625	<u>0,468</u> 1,25	<u>0,468</u> 2,50	<u>0,468</u> 5,00
F	<u>0,234</u> 0,00	<u>0,234</u> 0,004	<u>0,234</u> 0,009	<u>0,234</u> 0,019	<u>0,234</u> 0,039	<u>0,234</u> 0,078	<u>0,234</u> 0,156	<u>0,234</u> 0,312	<u>0,234</u> 0,625	<u>0,234</u> 1,25	<u>0,234</u> 2,50	<u>0,234</u> 5,00
G	<u>0,117</u> 0,00	<u>0,117</u> 0,004	<u>0,117</u> 0,009	<u>0,117</u> 0,019	<u>0,117</u> 0,039	<u>0,117</u> 0,078	<u>0,117</u> 0,156	<u>0,117</u> 0,312	<u>0,117</u> 0,625	<u>0,117</u> 1,25	<u>0,117</u> 2,50	<u>0,117</u> 5,00
H	<u>0,00</u> 0,00	<u>0,00</u> 0,004	<u>0,00</u> 0,009	<u>0,00</u> 0,019	<u>0,00</u> 0,039	<u>0,00</u> 0,078	<u>0,00</u> 0,156	<u>0,00</u> 0,312	<u>0,00</u> 0,625	<u>0,00</u> 1,25	<u>0,00</u> 2,50	<u>0,00</u> 5,00

Óleo essencial de citronela (mg/mL) ↑

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de citronela** e do **conservante metilparabeno** contra *Escherichia coli*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

Metilparabeno (mg/mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>7,50</u> 0,00	<u>7,50</u> 0,004	<u>7,50</u> 0,009	<u>7,50</u> 0,019	<u>7,50</u> 0,039	<u>7,50</u> 0,078	<u>7,50</u> 0,156	<u>7,50</u> 0,312	<u>7,50</u> 0,625	<u>7,50</u> 1,25	<u>7,50</u> 2,50	<u>7,50</u> 5,00
→ B	<u>3,75</u> 0,00	<u>3,75</u> 0,004	<u>3,75</u> 0,009	<u>3,75</u> 0,019	<u>3,75</u> 0,039	<u>3,75</u> 0,078	<u>3,75</u> 0,156	<u>3,75</u> 0,312	<u>3,75</u> 0,625	<u>3,75</u> 1,25	<u>3,75</u> 2,50	<u>3,75</u> 5,00
C	<u>1,875</u> 0,00	<u>1,875</u> 0,004	<u>1,875</u> 0,009	<u>1,875</u> 0,019	<u>1,875</u> 0,039	<u>1,875</u> 0,078	<u>1,875</u> 0,156	<u>1,875</u> 0,312	<u>1,875</u> 0,625	<u>1,875</u> 1,25	<u>1,875</u> 2,50	<u>1,875</u> 5,00
D	<u>0,937</u> 0,00	<u>0,937</u> 0,004	<u>0,937</u> 0,009	<u>0,937</u> 0,019	<u>0,937</u> 0,039	<u>0,937</u> 0,078	<u>0,937</u> 0,156	<u>0,937</u> 0,312	<u>0,937</u> 0,625	<u>0,937</u> 1,25	<u>0,937</u> 2,50	<u>0,937</u> 5,00
E	<u>0,468</u> 0,00	<u>0,468</u> 0,004	<u>0,468</u> 0,009	<u>0,468</u> 0,019	<u>0,468</u> 0,039	<u>0,468</u> 0,078	<u>0,468</u> 0,156	<u>0,468</u> 0,312	<u>0,468</u> 0,625	<u>0,468</u> 1,25	<u>0,468</u> 2,50	<u>0,468</u> 5,00
F	<u>0,234</u> 0,00	<u>0,234</u> 0,004	<u>0,234</u> 0,009	<u>0,234</u> 0,019	<u>0,234</u> 0,039	<u>0,234</u> 0,078	<u>0,234</u> 0,156	<u>0,234</u> 0,312	<u>0,234</u> 0,625	<u>0,234</u> 1,25	<u>0,234</u> 2,50	<u>0,234</u> 5,00
G	<u>0,117</u> 0,00	<u>0,117</u> 0,004	<u>0,117</u> 0,009	<u>0,117</u> 0,019	<u>0,117</u> 0,039	<u>0,117</u> 0,078	<u>0,117</u> 0,156	<u>0,117</u> 0,312	<u>0,117</u> 0,625	<u>0,117</u> 1,25	<u>0,117</u> 2,50	<u>0,117</u> 5,00
H	<u>0,00</u> 0,00	<u>0,00</u> 0,004	<u>0,00</u> 0,009	<u>0,00</u> 0,019	<u>0,00</u> 0,039	<u>0,00</u> 0,078	<u>0,00</u> 0,156	<u>0,00</u> 0,312	<u>0,00</u> 0,625	<u>0,00</u> 1,25	<u>0,00</u> 2,50	<u>0,00</u> 5,00

Óleo essencial de citronela (mg/mL) ↑

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de citronela** e do **conservante metilparabeno** contra *Staphylococcus aureus*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.



		Metabissulfito de sódio (mg/mL)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
B	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
C	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
D	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
E	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
F	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
G	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
H	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	

Óleo essencial de cravo (mg/mL) ↑

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de cravo** e do **conservante metabissulfito de sódio** contra *Staphylococcus aureus*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

		Metabissulfito de sódio (mg/mL)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>	<u>15,00</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
B	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>	<u>7,50</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
C	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>	<u>3,75</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
D	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>	<u>1,875</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
E	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>	<u>0,937</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
F	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>	<u>0,468</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
G	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>	<u>0,234</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	
H	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>	<u>0,00</u>
	<b>0,00</b>	<b>0,004</b>	<b>0,009</b>	<b>0,019</b>	<b>0,039</b>	<b>0,078</b>	<b>0,156</b>	<b>0,312</b>	<b>0,625</b>	<b>1,25</b>	<b>2,50</b>	<b>5,00</b>	

Óleo essencial de cravo (mg/mL) ↑

Esquema do teste de “checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de cravo** e do **conservante metabissulfito de sódio** contra *Escherichia coli*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.

Metabissulfito de sódio (mg/mL)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	<u>15,00</u> <b>0,00</b>	<u>15,00</u> <b>0,004</b>	<u>15,00</u> <b>0,009</b>	<u>15,00</u> <b>0,019</b>	<u>15,00</u> <b>0,039</b>	<u>15,00</u> <b>0,078</b>	<u>15,00</u> <b>0,156</b>	<u>15,00</u> <b>0,312</b>	<u>15,00</u> <b>0,625</b>	<u>15,00</u> <b>1,25</b>	<u>15,00</u> <b>2,50</b>	<u>15,00</u> <b>5,00</b>	
B	<u>7,50</u> <b>0,00</b>	<u>7,50</u> <b>0,004</b>	<u>7,50</u> <b>0,009</b>	<u>7,50</u> <b>0,019</b>	<u>7,50</u> <b>0,039</b>	<u>7,50</u> <b>0,078</b>	<u>7,50</u> <b>0,156</b>	<u>7,50</u> <b>0,312</b>	<u>7,50</u> <b>0,625</b>	<u>7,50</u> <b>1,25</b>	<u>7,50</u> <b>2,50</b>	<u>7,50</u> <b>5,00</b>	
C	<u>3,75</u> <b>0,00</b>	<u>3,75</u> <b>0,004</b>	<u>3,75</u> <b>0,009</b>	<u>3,75</u> <b>0,019</b>	<u>3,75</u> <b>0,039</b>	<u>3,75</u> <b>0,078</b>	<u>3,75</u> <b>0,156</b>	<u>3,75</u> <b>0,312</b>	<u>3,75</u> <b>0,625</b>	<u>3,75</u> <b>1,25</b>	<u>3,75</u> <b>2,50</b>	<u>3,75</u> <b>5,00</b>	
→ D	<u>1,875</u> <b>0,00</b>	<u>1,875</u> <b>0,004</b>	<u>1,875</u> <b>0,009</b>	<u>1,875</u> <b>0,019</b>	<u>1,875</u> <b>0,039</b>	<u>1,875</u> <b>0,078</b>	<u>1,875</u> <b>0,156</b>	<u>1,875</u> <b>0,312</b>	<u>1,875</u> <b>0,625</b>	<u>1,875</u> <b>1,25</b>	<u>1,875</u> <b>2,50</b>	<u>1,875</u> <b>5,00</b>	
E	<u>0,937</u> <b>0,00</b>	<u>0,937</u> <b>0,004</b>	<u>0,937</u> <b>0,009</b>	<u>0,937</u> <b>0,019</b>	<u>0,937</u> <b>0,039</b>	<u>0,937</u> <b>0,078</b>	<u>0,937</u> <b>0,156</b>	<u>0,937</u> <b>0,312</b>	<u>0,937</u> <b>0,625</b>	<u>0,937</u> <b>1,25</b>	<u>0,937</u> <b>2,50</b>	<u>0,937</u> <b>5,00</b>	
F	<u>0,468</u> <b>0,00</b>	<u>0,468</u> <b>0,004</b>	<u>0,468</u> <b>0,009</b>	<u>0,468</u> <b>0,019</b>	<u>0,468</u> <b>0,039</b>	<u>0,468</u> <b>0,078</b>	<u>0,468</u> <b>0,156</b>	<u>0,468</u> <b>0,312</b>	<u>0,468</u> <b>0,625</b>	<u>0,468</u> <b>1,25</b>	<u>0,468</u> <b>2,50</b>	<u>0,468</u> <b>5,00</b>	
G	<u>0,234</u> <b>0,00</b>	<u>0,234</u> <b>0,004</b>	<u>0,234</u> <b>0,009</b>	<u>0,234</u> <b>0,019</b>	<u>0,234</u> <b>0,039</b>	<u>0,234</u> <b>0,078</b>	<u>0,234</u> <b>0,156</b>	<u>0,234</u> <b>0,312</b>	<u>0,234</u> <b>0,625</b>	<u>0,234</u> <b>1,25</b>	<u>0,234</u> <b>2,50</b>	<u>0,234</u> <b>5,00</b>	
H	<u>0,00</u> <b>0,00</b>	<u>0,00</u> <b>0,004</b>	<u>0,00</u> <b>0,009</b>	<u>0,00</u> <b>0,019</b>	<u>0,00</u> <b>0,039</b>	<u>0,00</u> <b>0,078</b>	<u>0,00</u> <b>0,156</b>	<u>0,00</u> <b>0,312</b>	<u>0,00</u> <b>0,625</b>	<u>0,00</u> <b>1,25</b>	<u>0,00</u> <b>2,50</b>	<u>0,00</u> <b>5,00</b>	
	Óleo essencial de cravo (mg/mL)								↑				

Esquema do teste de “ checkerboard” em microplaca de 96 poços, representando as combinações entre o **óleo essencial de cravo** e do **conservante metabissulfito de sódio** contra *Salmonella typhi*. As setas indicam a CIM das substâncias isoladamente, a região em vermelho evidencia a CIM da associação das duas substâncias e a área sombreada (cinza) indica crescimento microbiano visível.