

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do
extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling

Delia Manuela Luna Pinto

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof.^a. Dr.^a. Telma Mary Kaneko

São Paulo
2010

Delia Manuela Luna Pinto

Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de
Minthostachys setosa (Briq.) Epling

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dra Telma Mary Kaneko
Orientador/presidente

1.º examinador

2.º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2010.

DEDICATÓRIA

Á Deus, acima de tudo.

Aos amores da minha vida:

À memória do meu querido e inesquecível pai Roman, pelo exemplo e os ensinamentos que deixo gravados no meu coração.

À minha querida mãe Liveria, a quem eu tenho muito respeito e admiração pelo amor incondicional, pelos valores passados com tanto carinho, pela dedicação e bom exemplo de vida.

Ao Eduardo, meu amado esposo pelo amor, por respeitar minhas escolhas e pelo constante incentivo e compreensão nos momentos difíceis da minha vida.

A Carlos e Ayrton que são o motivo e a inspiração do desenvolvimento do meu dia a dia.

Aos meus queridos irmãos, sobrinhos, sogros e a minha família toda pelo carinho, força e apoio incondicional que sempre me brindaram.

À minha orientadora, Professora Doutora Telma Mary Kaneko, pelos ensinamentos no decorrer do meu mestrado, pela orientação, paciência e apoio nos momentos difíceis e pelo papel de mãe e amiga que desenvolveu desde que a conheci.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Professora Terezinha pelas palavras e exemplo de carinho e força para continuar no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Professor Paulo Moreno que contribuiu na realização da cromatografia do óleo essencial da planta e enriqueceu minha formação com seus conhecimentos.

À Professora Edna Tomiko Kato pela contribuição no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Biólogo Justo Mantilla pela contribuição no processo de extração do óleo essencial da planta.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Professora Irene Satiko, José Sobrinho, Márcia Lombardo, Marcos Enoque, Gabriele Ruas, Wagner, Cibeli Firelli, Miriam, Rafael Takamoto, Juliano Moraes, Anderson, Gláucia Mello, Tulia Botelho, Peqi Noriega, Marcos Okida e Wesley Oliveira, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pela companhia, pelos momentos de alegrias e tristezas compartilhadas que tornou o laboratório um ambiente de família.

Aos meus grandes amigos Adelaida, Roxana, Zoraida, Vanessa, Ana, Henry, Angel, Monica, Sebastian, Patrícia, Luigui, Inara, Teddy, Lenin, Tahiomara, Paulo Henrique e Leandro, pelos momentos compartilhados.

À todos do departamento de Farmácia e da biblioteca e amigos que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

*"Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,
e a prova de que duas almas
não se encontram ao acaso. "*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

PINTO, D. M. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling. São Paulo, 2009.** [Dissertação de mestrado - Área de concentração: Fármaco e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-SP].

A espécie *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling é uma planta arbustiva aromática da família Lamiaceae que ocorre ao longo dos Andes, da Venezuela até a Argentina. A utilização popular dessa planta para diferentes fins medicinais demanda a investigação dos seus efeitos farmacológicos. O objetivo proposto foi a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, e dos seus componentes majoritários, e do extrato hidroalcoólico liofilizado das partes aéreas da *Minthostachys setosa*. A planta foi submetida à extração, por percolação, obtendo-se o extrato hidroalcoólico, e por arraste a vapor, o óleo essencial. O extrato hidroalcoólico e o seu liofilizado foram submetidos à análise cromatográfica em camada delgada, mostrando a presença de flavonoides e taninos. O óleo essencial foi submetido à cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e apresentou 39 compostos, sendo os majoritários a pulegona (28,6%), a mentona (12,6%) e a isomentona (11%). O método de diluição em meio líquido em microplacas foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato liofilizado, do óleo essencial e dos seus compostos majoritários. As amostras foram desafiadas frente *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404, comparando-se a eficácia com antibióticos específicos. O extrato liofilizado mostrou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1,25 mg/mL para todos os microrganismos estudados, com exceção do *Aspergillus niger*, que não apresentou atividade. O óleo essencial mostrou valores de CIM entre 0,4 e 2,8 µg/mL, conforme o microrganismo desafiado. A pulegona mostrou valores de CIM entre 0,8 e 1,6 µg/mL e a mentona apresentou somente atividade frente *S. aureus*, com CIM de 2,9 µg/mL antimicrobiana. Portanto, o extrato liofilizado, o óleo essencial e os seus compostos majoritários da *Minthostachys setosa* podem ser considerados candidatos à utilização como antimicrobianos em formulações cosméticas e farmacêuticas.

Palavras-chave: *Minthostachys setosa*. Extrato hidroalcoólico. Óleo essencial. Pulegona. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACTS

PINTO, D. M. L. **Evaluation of antimicrobial activity of essential oil and extract of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling.** [Master degree dissertation- University of São Paulo - Pharmaceutical Sciences College].

The Minthostachys setosa (Briq.) Epling specie plants aromatic shrub of the Lamiaceae family occurs throughout Andes, since Venezuela until Argentina. The popular use of this plant for different medicinal ends has been as indicative to the inquiry of the pharmacologic effect. The aim of the work was to evaluate the antimicrobial activity of the essential oil and his majority components, and hydroalcoholic extract and his lyophilized product of the *Minthostachys setosa* aerial parts. The plant had been submitted to the extraction by percolating and to obtain the hydroalcoholic extract, and by steam distillation the essential oil. The hydroalcoholic extract and his lyophilized product have submitted to the chromatographic analysis in thin layer, showing in its composition the presence of flavonoids and tannins. The chemical composition of essential oils were determined by spectrometry of masses (CG-EM) and it has presented 39 composites, being majority a pulegone (28.6%), the mentone (12.6%) and isomentone (11%). The antimicrobial activity of the lyophilized extract, the essential oil and majority components were assessed by microdilution method. The samples had challenged against the *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, the *Candida albicans* ATCC 10231 and the to *Aspergillus niger* ATCC 16404, and the specific antibiotics have been used as positive control. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determined of the lyophilized extract for all the microorganisms studied has been of 1,25 mg/mL, with exception of the to *A. niger* that it has not presented activity. The essential oil has showed lower MIC, between 0,4 and 2,8 µg/mL, against different challenged microorganisms. Pulegone has showed MIC between 0,8 - 1,6 µg/mL and mentona the MIC against *S. aureus* of 2,9 µg/mL. Therefore, the lyophilized extract, the essential oil and its majority components of the *M. setosa* can be considered candidates the use as antimicrobial in cosmetic and pharmaceutical formulations.

Keywords: *Minthostachys setosa*. Essential oil. Antimicrobial activity. Hydroalcoholic extract. Pulegone.

Lista de Figuras

Figura 1 - Características da flor das Lamiaceas	3
Figura 2 - Distribuição geográfica do gênero <i>Minthostachys</i> na Cordilheira dos Andes.....	5
Figura 3 - Inflorescência da <i>Minthostachys</i>	6
Figura 4 - <i>Minthostachys setosa</i> (Briq.) Epling.....	7
Figura 5 - Formação <i>cabeça-cauda</i> dos esqueletos carbonados dos compostos mono- e sesquiterpenoides, constituintes majoritários dos óleos voláteis	9
Figura 6 - Compostos majoritários do óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i>	10
Figura 7- Sítios do mecanismo de ação dos óleos essenciais frente à célula bacteriana	12
Figura 8 - Fluxograma dos experimentos.....	19
Figura 9 - Esquema de um conjunto destilador para óleos essenciais	21
Figura 10 - Análise para a identificação dos componentes do óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i>	24
Figura 11 - Distribuição da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial, pulegona mentona e extrato liofilizado da <i>Minthostachys setosa</i> frente a diferentes microrganismos.....	27
Figura 12 - Inibição do extrato da <i>Minthostachys setosa</i> em comparação com antibiótico 1mg/mL frente <i>Escherichia coli</i> 10 ⁵ UFC/mL ATCC 8739, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 10 ⁵ UFC/mL, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 10 ⁵ UFC/mL e <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 10 ⁴ UFC/mL	30
Figura 13 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i>	34
Figura 14 - Espectro de massas da pulegona comparados com bases de dados de Adams (2007) e Wiley 275.....	35
Figura 15 - Espectro de massas da mentona comparados com bases de dados de Adams (2007) e Wiley 275.....	35

Figura 16 - Comportamento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i> durante 24 horas.....	37
Figura 17 - Comportamento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona durante 24 horas	37
Figura 18 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial <i>Minthostachys. setosa</i> (A), Pulegona (B) e mentona frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 10^5 UFC/mL após 24 horas de incubação.....	38
Figura 19 - Comportamento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i> durante 24 horas.....	39
Figura 20 - Comportamento de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona durante 24 horas	40
Figura 21 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial <i>Minthostachys. setosa</i> (A), Pulegona (B) e mentona frente <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 10^5 UFC/mL após 24 horas de incubação.....	41
Figura 22 - Comportamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i> durante 24 horas.....	42
Figura 23 - Comportamento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona a diferentes concentrações durante 24 horas.....	43
Figura 24 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial <i>Minthostachys setosa</i> (A), Pulegona (B) e mentona frente <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 10^5 UFC/mL após 24 horas de incubação.....	44
Figura 25 - Comportamento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10203 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i> durante 24 horas	45
Figura 26 - Comportamento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10203 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona a diferentes concentrações durante 48 horas.....	46

- Figura 27 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial *Minthostachys setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Candida albicans* ATCC 10203 10^4 após 48 horas de incubação.....47
- Figura 28 - Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial frente a *Aspergillus niger* a 10^3 UFC/mL48
- Figura 29 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial de *M. setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Aspergillus niger* ATCC 16404 10^3 UFC/mL após 72 horas de incubação.....49

Lista de Tabelas e Equações

Tabela 1 - Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos fluido e liofilizado de <i>Minthostachys setosa</i> em diferentes fases moveis.	28
Tabela 2 - Porcentagem de inibição do extrato liofilizado da <i>Minthostachys setosa</i> em comparação com antibiótico (1mg/mL) frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 a 10^5 UFC/mL e <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a 10^4 UFC/mL.	29
Tabela 3 - Características organolépticas e propriedades físico-químicas do óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i> (Briq.)	31
Tabela 4 - Composição química do óleo essencial da <i>Minthostachys setosa</i> (Briq.)	33
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração bactericida ou Fungicida Mínima (CBM/CFM) do óleo essencial de <i>Minthostachys setosa</i> da pulegona e da mentona.....	50
Equação 1 - Para obtenção do índice de Kovast	23

Lista de siglas e abreviaturas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	Cromatografia de Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
D/M	Dimetilsulfóxido/Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EL	Extrato Liofilizado
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IEPLAM	<i>Instituto de Ecologia y Plantas Medicinales Cusco-Peru</i>
M	Mentona
MeOH	Metanol
MHA	Mueller Hinton Agar
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
OE	Óleo essencial
P	Pulegona
DAS	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SDB	<i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SM	Espectrometria de massas
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de siglas e abreviaturas

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	3
2.1. <i>Minthostachys setosa</i> (Briq.) Epling (Lamiaceae)	3
2.2. Óleos essenciais	8
2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana	11
3. Objetivo	17
4.1. Material	18
4.2. Métodos	18
4.2.1. Preparo da planta.....	18
4.2.2. Obtenção do extrato liofilizado	18
4.2.3. Análise cromatográfica em camada delgada do extrato liofilizado e suas frações	20
4.2.4. Obtenção do óleo essencial	20
4.2.5. Características organolépticas e propriedades físico-químicas do óleo essencial	21
4.2.5.1. Características organolépticas.....	21
4.2.5.2. Determinação da densidade relativa	21
4.2.5.3. Determinação do índice de refração	22
4.2.5.4. Solubilidade	22
4.2.6. Determinação da composição do óleo essencial por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/SM)	22

4.2.7. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato, do óleo essencial e dos seus componentes majoritários	25
4.2.7.1. Microrganismo testado.....	25
4.2.7.2. Meios de cultura utilizados.....	25
4.2.7.3. Preparação e avaliação da viabilidade do inóculo	25
4.2.7.4. Controle positivo	26
4.2.7.5. Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
5. Resultados e Discussão	28
6. Conclusões.....	52
Referências	53

1. Introdução

Durante séculos, as plantas medicinais eram a única fonte de agentes terapêuticos para o ser humano. A diversidade da utilização destas foi resultante do conhecimento empírico da ação dos vegetais nas doenças por diferentes grupos étnicos. Na atualidade, muitas dessas plantas são incluídas na terapêutica convencional para tratamento de várias doenças (VIEIRA, 2005; MANTILLA, 2005). Assim como o desenvolvimento da sociedade humana, essa sistemática esteve intimamente ligada ao uso dos recursos naturais que estavam à disposição da humanidade. Ainda hoje todos os aspectos ligados ao conhecimento sobre as plantas medicinais continuam evoluindo, permitindo-se alcançar novas perspectivas na utilização desse recurso (CUNHA, 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem se mostrado muito interessada nesses sistemas terapêuticos, considerando que aproximadamente 80% da população mundial dependem principalmente da medicina popular para seus cuidados primários de saúde (AKERELE, 1984; FARNSWORTH et al., 1985; CRAGG, 1997).

As plantas utilizadas na medicina popular são fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos para a síntese de grande número de fármacos. Sendo assim, estes produtos, encontrados na natureza, revelam grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003). A procura de novas moléculas farmacêuticas tem como fonte de pesquisa a riqueza de informações do uso de plantas na medicina popular. Nesse sentido, trabalhos científicos relacionados a medicamentos mostraram que, nos últimos 25 anos, 25% de princípios ativos utilizados são de origem natural ou semissintética (CRAGG et al., 1997, 2003).

Entre as ações terapêuticas das plantas medicinais, a atividade antimicrobiana é uma das mais relevantes frente à taxa de mortalidade existente e à resistência antimicrobiana. Rios e Recio (2005) realizaram levantamento do número de publicações no *Pub-Med* sobre essa atividade das plantas medicinais e mostraram que, entre os anos 1966 e 1994, o número de trabalhos publicados foi 115, enquanto entre os anos 1995 e 2004, este número de publicações foi de 307.

Em pesquisa mais abrangente da autora foram encontradas 631 publicações referentes a essa atividade em plantas medicinais de 1962 até 2010.

Muitos destes estudos sobre a determinação da atividade antimicrobiana de plantas de uso popular são focados na utilização de extratos (NGWENDSON et al., 2003), óleos essenciais (ZAIKA et al., 1983; CONNOR; BEUCHAT, 1984; JANSSEN et al., 1988; OUATTARA et al., 1997) ou compostos isolados, como alcaloides (KLAUSMEYER et al., 2004), flavonoides (SOHN et al., 2004), lactonas de sesquiterpeno (LIN et al., 2003), diterpenos (EL-SEEDI et al., 2002), triterpenos (KATERERE et al., 2003), entre outros.

Os óleos essenciais têm ganhado importância e a avaliação dessa propriedade abrange grande variedade de microrganismos contra os quais foram testados, incluindo microrganismos deteriorantes de alimentos (CONNOR, BEUCHAT, 1984; OUATTARA et al., 1997); de produtos cosméticos e de medicamentos (PINTO et al., 2003; BOONCHILD; FLEGEL, 1982; GHANNOUM, 1988) e aqueles que afetam plantas e animais (IEVEN et al., 1982; ROMERIO et al., 1989).

A família Lamiaceae apresenta gêneros, como a *Minthostachys*, que são ricos em óleos essenciais e têm terpenos com ação antiparasitária, antiinflamatória e antimicrobiana (SENATORE, 1998). No entanto, apenas óleos essenciais de algumas dessas espécies foram estudados, como de *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling encontrada na Argentina, que mostrou atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) e bactérias Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) (DE FEO et al., 1998).

A *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling é também utilizada na medicina popular pelos moradores dos Andes no Peru, por apresentar os mesmos usos tradicionais da espécie acima mencionada (SENATORE, 1998). Ressalta-se que estudos científicos, explorando as atividades farmacológicas, não foram ainda conduzidos; assim, torna-se relevante e promissor avaliar o efeito antimicrobiano do óleo essencial, dos seus componentes majoritários e do extrato hidroalcoólico de *M. setosa*.

2. Revisão da literatura

2.1. *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling (Lamiaceae)

M. setosa é uma espécie que se encontra dentro da família Lamiaceae (Labiatae), que é composta por aproximadamente 224 gêneros e 5.600 espécies. Muitas das espécies desta família são utilizadas na medicina popular e, assim, representam importância econômica. Estas plantas crescem em forma de arbustos e árvores, tendo, geralmente, caule quadrangular, com folhas opostas, inteiras ou divididas, inflorescência racemosa, flores hermafroditas e zigomorfas, cálice com cinco sépalas juntas, corola com cinco pétalas geralmente bilabiadas e dois ou quatro estames livres, gineceu com ovário superior com dois carpelos, um estilo e dois estigmas e fruto em núcula (HEINRICH et al., 2004; SIMÕES, 2007) (Figura 1). Devido às propriedades aromáticas que apresenta, a grande maioria dos gêneros da família Lamiaceae é empregada na cosmetologia e na alimentação (SENATORE, 1998). Entre os gêneros mais estudados da família Lamiaceae, destaca-se *Rosmarinus officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Lavandula officinalis* L., *Thymus vulgaris* L. e *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.

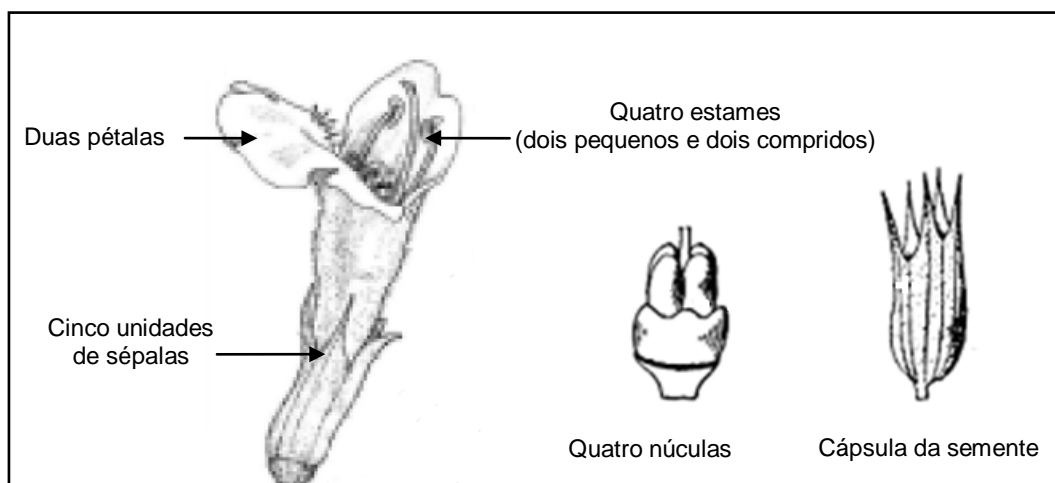


Figura 1 - Características da flor das Lamiaceas

Minthostachys é um gênero de arbustos da família da hortelã (Lamiaceae) que ocorre na Cordilheira dos Andes, da Venezuela à Argentina (Figura 2), sendo este último país e o Peru os maiores produtores do óleo de *Minthostachys* (DE FEO et al., 1998) (Figura 2). Os estudos taxonômicos e sistemáticos do gênero iniciaram-se em 1936 (Briq.) quando foram identificadas 12 espécies. Posteriormente, em estudos realizados entre 2002 e 2009, identificaram-se mais cinco espécies do gênero *Minthostachys* que apresentaram propriedades relevantes, sendo utilizadas na medicina popular, na cosmetologia e na alimentação (SCHMIDT-LEBUHN, 2008b).

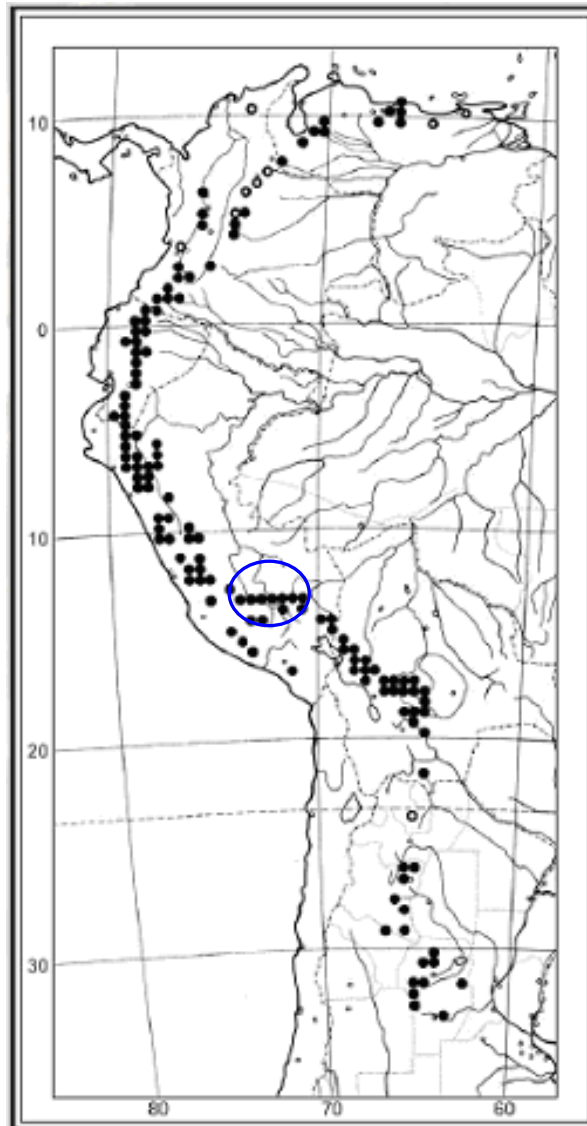
Entre as espécies que compõem o gênero *Minthostachys* se encontram a *M. glabrescens* Epling; a *M. mollis*; a *M. verticillata*; a *M. andina* (Brett.); a *M. spicata* (Benth.) e a *M. setosa*. Esse gênero é de interesse pela facilidade de obtenção de seus óleos aromáticos, que são encontrados nas glândulas de folhas. Tradicionalmente, os usuários recolhem a planta para ser utilizada em infusão como digestivo, sedativo, antiespasmódico, broncodilatador, antirreumático, inseticida, antimicótico e antiparasitário. É também utilizada como flavorizante na produção de bebidas alcoólicas e refrescantes, sendo amplamente empregada na culinária como condimento (DIMITRI, 1980; SORAU; BANDONI, 1994; DE FEO et al., 1998).

A *M. mollis* é utilizada em infusão como carminativo, digestivo e antiespasmódico (BANDONI et al., 1976). Seu óleo essencial apresenta atividades antimicótica, antiparasitária, antibacteriana, antiviral, vermífuga, sedativa e antidiarreica. A infusão da planta fresca é amplamente utilizada para doenças respiratórias e contra infecções do trato urinário (DE FEO, 1992; ANESINI; PEREZ, 1993; PEREZ; ANESINI, 1994; ACHA, 2001; UGARTE et al., 1984; ALIAGA; FELDHEIM, 1985; ULLOA, 2006; PRIMO et al., 2001).

A *M. setosa* é cultivada nos altiplanos andinos e apresenta características bastante semelhantes às espécies já mencionadas. O rendimento de extração do óleo essencial é igual ou superior a outras espécies, sendo alvo de interesse comercial.

A *M. setosa* (Figura 3, 4), pertencente à subclasse Asteridae da classe Magnoliophyta, conhecida popularmente como “Arash muna” e “Muña”, é uma

planta que cresce a 3.800 metros de altitude e se encontra distribuída ao longo dos Andes, da Venezuela até Argentina (EPLING,1936; SCHMIDT-LEBUHN, 2008b) (Figura 2). A descrição morfológica apresenta 22 características de identificação, que foram relatadas por Schmitht-Lebum (2008b).



○ Local do material colhido para desenvolvimento do presente trabalho

Figura 2 - Distribuição geográfica do gênero *Minthostachys* na Cordilheira dos Andes (SCHMIDT LEBUHN, 2007)



Figura 3 - Inflorescência da *Minthostachys*. Fonte: <http://www.minthostachys.com/> (Acesso em 16, Mar 2008)



Figura 4 - *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling, A: Planta fresca; B: planta seca colhida pela autora

Essa planta cresce na forma silvestre e é tradicionalmente utilizada pelas comunidades campesinas dos Andes peruano, pelo seu alto valor nutritivo e no tratamento de diferentes afecções e enfermidades (MANTILLA, 2005). Os incas, antepassados do povo andino, já a utilizava como conservante de alimentos em especial a batata e o milho, em estocagem, cobrindo com folhas frescas os alimentos que desejavam preservar. Esta planta é também empregada como antiinflamatório, antirreumático e expectorante, em caso de gripes e resfriado. As folhas secas e frescas são utilizadas como flavorizante na culinária dos povos andinos.

Como outros membros da família de hortelã, o gênero *Minthostachys* produz diversos óleos essenciais. Estes podem ter propriedades medicinais ou são simplesmente utilizados pelo sabor agradável na culinária, como em chá e cerveja, e na cosmetologia, devido ao seu odor mentolado. Em relação ao óleo essencial de *M. setosa*, Senatore (1998) realizou pela primeira vez a identificação por cromatografia

a gás, na qual foram mostrados como compostos majoritários a pulegona, a mentona e a isomentona.

2.2. Óleos essenciais

A ISO (*International Standard Organization*) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste a vapor, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES; SPITZER, 2007, 467p). São chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essenciais, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentam solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos (SIMÕES; SPITZER et al., 2007, 467p).

As plantas ricas em óleos voláteis são as angiospermas dicotiledôneas, tais como as das famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae entre outras (SIMÕES; SPITZER, 2007, 473p). Dependendo da família, os óleos voláteis podem-se localizar em estruturas secretoras especializadas, tais como em pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauráceas, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Os óleos voláteis podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores, folhas ou ainda nas cascas dos caules, madeira, raiz, rizoma, fruto ou sementes; dependendo da localização do óleo sua composição pode variar. A composição química depende também da época de colheita, das condições climáticas e do solo.

Os constituintes variam de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas até compostos como enxofre. Na mistura,

tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações e teores. Os terpenos são os principais responsáveis químicos pela fragrância e pelos usos medicinais e culinários (DORMAN; DEANS, 2000).

A grande maioria dos óleos voláteis é derivada de fenilpropanoides ou de terpenoides (Figura 5), sendo que esses últimos preponderam, constituindo uma grande variedade de substâncias vegetais. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos voláteis são os monoterpênicos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpênicos. Outros terpenoides, como os diterpenos, são encontrados apenas em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (STEINEGGER; HANSEL, 1992).

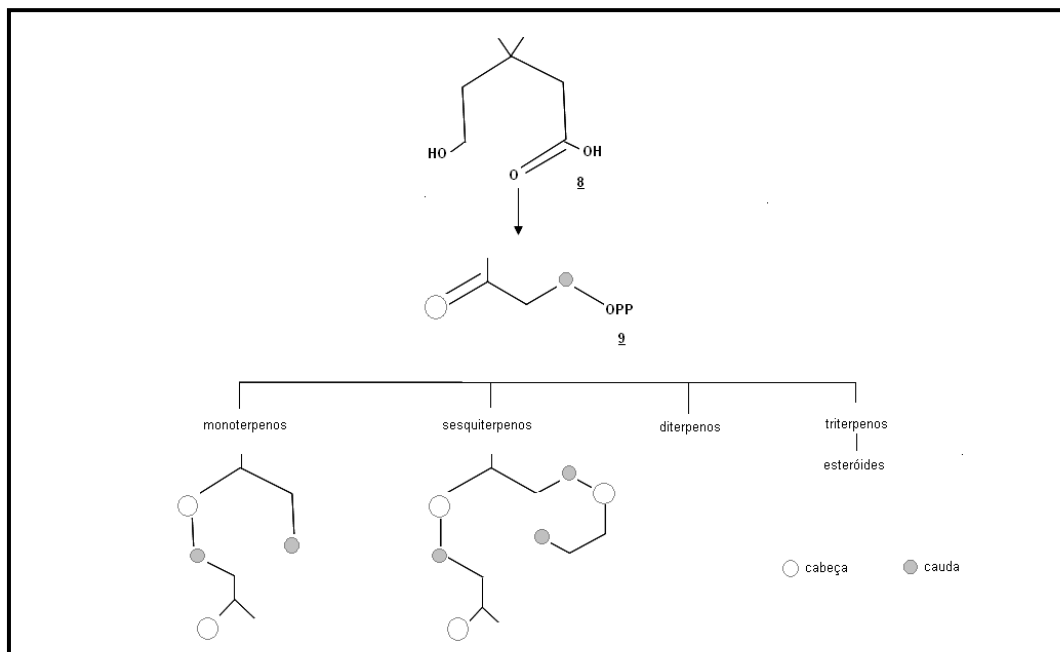


Figura 5 - Formação *cabeça-cauda* dos esqueletos carbonados dos compostos mono- e sesquiterpenoides, constituintes majoritários dos óleos voláteis (Adaptado de Simões, 2007, 470p)

A pulegona e a mentona (Figura 6) são os componentes majoritários dos gêneros *Menta* e *Minthostachys*, geralmente a primeira está presente em maior porcentagem tanto na *Mentha pulegium* (L.) Griseb (GUENTHER, 1949) quanto na *Minthostachys* (BANCHIO et al., 2005a). A pulegona pode ser tóxica, quando em

grande quantidade, produzindo aborto e danos ao fígado (ANDERSON et al., 1996; LAMIRI et al., 2001; HARREWIJN et al., 2001). Essa toxicidade é danosa, também, para pragas e parasitas, o que justifica sua utilização como conservante de alimentos. A mentona apresenta propriedades digestivas e não tem toxicidade.

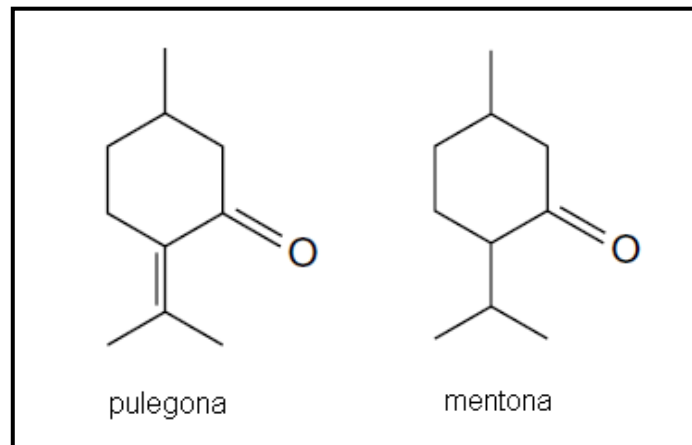


Figura 6 - Compostos majoritários do óleo essencial da *Minthostachys setosa*

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta, são utilizados a enfloração, o arraste por vapor de água, a extração com solventes orgânicos, a prensagem e a extração por CO₂ supercrítico. Frequentemente é necessário, após a extração, branquear, neutralizar ou retificar os óleos voláteis extraídos, eliminando, assim, os componentes irritantes ou de odor desagradável, obtendo-se produtos finais com alto valor.

A relativa instabilidade das moléculas que constituem os óleos voláteis torna difícil sua conservação. As possibilidades de degradação são inúmeras e podem ser estimadas através da medição de alguns índices (peróxido, refração), da determinação de características físico-químicas (viscosidade, miscibilidade em álcool, poder rotatório), além da análise por cromatografia gasosa (CG). Para evitar a deterioração e reduzir o valor comercial dos óleos voláteis, estes devem ser guardados dessecados (com Na₂SO₄ anidro) e livres de impurezas insolúveis. Deve-se acondicionar o óleo em embalagem primária neutra e âmbar, de volume pequeno, completamente cheio, hermeticamente fechado e estocado a baixas temperaturas ou de preferência em atmosfera de nitrogênio (SIMOES; SPITZER, 2007, 475-477p).

2.3. Extratos vegetais

Os extratos são preparações concentradas, obtidas de drogas vegetais ou animais, frescas ou secas, por meio de um solvente apropriado, seguidas de sua evaporação total ou parcial e ajuste do concentrado a padrões previamente estabelecidos. A extração pode ser feita por decocção, infusão, digestão, maceração, percolação ou, ainda, pela expressão de partes da planta fresca, de acordo com a técnica indicada para cada caso. A percolação é o processo indicado na extração da maioria das drogas. O tempo de maceração e a velocidade de gotejamento do mênstruo variam com a droga, de modo a compensar as peculiaridades da extração (FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1959).

O gênero *Minthostachys*, em forma de infusão de planta fresca e extrato aquoso, é amplamente utilizado para doenças respiratórias e contra infecções do trato urinário (DE FEO, 1992; ANESINI; PEREZ, 1993; BRANCO, 1982). No entanto, na literatura não são encontrados estudos desse gênero referentes aos extratos com solventes orgânicos.

2.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

Muitas espécies vegetais têm sido usadas, pelas características antimicrobianas, através de compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (NASCIMENTO et al., 2000).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e de seus componentes, isolados ou não, foram avaliadas e revisadas por diferentes autores (LIS-BALCHIN; DEANS, 1997; JAIN; KAR 1971; INOUE et al., 1983; GARG; DENGRE, 1986; RIOS et al., 1987; DEANS, SVOBODA, 1988, 1989; CRUZ et al.,

1989; RECIO et al., 1989; CRESPO et al., 1990; CARSON et al., 1995; LARRONDO et al., 1995; PATTNAIK et al., 1995; CARSON et al., 1996; NENOFF et al., 1996; RIOS et al., 1988).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais para atividade antimicrobiana está relacionado com a perturbação da membrana citoplasmática e a interrupção da força motriz de prótons, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (BURT, 2004). Os trabalhos referentes a esse mecanismo foram também estudados, mostrando a ocorrência da degradação da parede celular (HELANDER et al., 1998; THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989); dano da membrana citoplasmática (KNOBLOCH et al., 1989; OOSTERHAVEN, POOLMAN, SMID, 1995; SIKKEMA, DE BONT, POOLMAN, 1994; ULTEE, BENNINK, MOEZELAAR, 2002; ULTEE et al., 2000); dano da membrana proteica (ULTEE, KETS, SMID, 1999; JUVEN et al., 1994); extravasamento ou saída dos conteúdos da célula (COX et al., 2000; GUSTAFSON et al., 1998; HELANDER, et al., 1998; LAMBERT et al., 2001; OOSTERHAVEN, POOLMAN; SMID, 1995); coagulação do citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998); esgotamento da força motriz protônica (ULTEE, KETS, SMID, 1999).

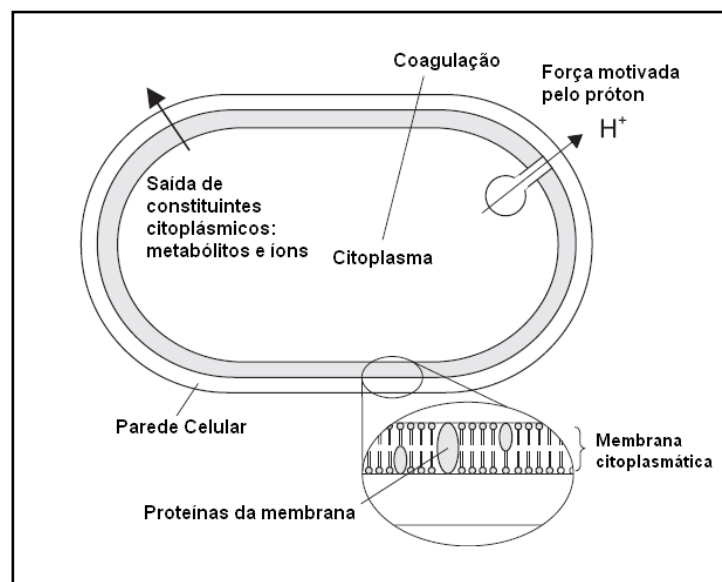


Figura 7- Sítios do mecanismo de ação dos óleos essenciais frente à célula bacteriana (Adaptado de BURT, 2004)

Vários métodos são utilizados para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos e dos óleos vegetais. Os ensaios mais utilizados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e/ou Fungicida (CBM, CFM) são o de difusão em ágar, de macrodiluição e microdiluição (DEANS, RITCHIE, 1987; PINTO, KANEKO, OHARA, 2003; COLLINS, 1995; MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 2000). As variações referentes à determinação da CIM de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais.

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólida e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a difusão da substância ensaiada (BARRY; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2000; PINTO; KANEKO; OHARA, 2003).

A avaliação é comparativa frente a um padrão e o diâmetro da zona ou o halo de inibição de crescimento (BARRY; THORNSBERRY, 1991). No método há necessidade de controle positivo, empregando sempre um padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos (BARBOUR et al., 2004; CHATTOPADHYAY et al., 2001; FERESIN et al., 2001; JETTY; IYENGAR, 2000; KARAMAN et al., 2003; RAJANI et al., 2002; SCAZZOCCHIO et al., 2001; SHRIMALI et al., 2001; SPRINGFIEL et al., 2003).

Para as condições de incubação é recomendada a temperatura de 35 a 37 °C para bactérias durante 24 a 48 horas e para fungos de 25 a 27 °C por 48 a 72 horas (CARVALHO et al., 2002; CHANDRASEKARAM; VENKATESALU, 2004; KARAMAN et al., 2003; MOODY; ADEBIYI; ADENIYI, 2004; RAJANI et al., 2002; SPRINGFIEL et al., 2003). As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana pelo método de difusão são por meios de difusão em disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003). O teste

de difusão em disco é aceito pela FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Dorman e Deams (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas e de 21 terpenoides e fenilpropanoides componentes que contêm os óleos estudados, comparando com o comportamento de antibiótico frente ao crescimento microbiano utilizando o método de difusão em agar frente a 25 microrganismos.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Chrysanthemum indicum* Linné (CI) foi testada por Shunying e colaboradores (2005), utilizando o método de difusão em disco. Uma suspensão dos microrganismos testados foi colocada sobre as placas contendo meios de cultura. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 15 µL das alíquotas de óleo diluídas e colocadas nas placas. As placas foram incubadas a 4°C, por 2 horas, seguidas por incubação a 37°C por 24 horas; em seguida, as zonas de inibição foram medidas.

No estudo conduzido por Tadeo e colaboradores (2005), os extratos hidroalcoólicos de oito espécies de plantas medicinais usadas no tratamento de distúrbios de pele foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana em relação a bactérias e fungos conhecidos por causarem diferentes tipos de infecções cutâneas. A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método de difusão em ágar nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/mL, no caso de extratos brutos, e de 25 e 5 mg/mL para as frações. Metanol, clorofórmio e água destilada foram usados como controle negativo; gentamicina e cetoconazol como controle positivo. As frações clorofórmio e éter de petróleo da *Lippia adoensis* (Hochst) foram mais ativas contra bactérias.

Voravunthikunchai e colaboradores (2004) determinaram o valor de CIM de extratos etanólicos e aquosos de plantas medicinais que produziam zonas de inibição utilizando método de difusão em ágar; amicacina, ampicilina, gentamicina, kanamicina e tetraciclina foram utilizadas como amostras de referência. E um microlitro de cada cultura de bactérias foi colocado em MHA (Mueller Hinton Agar), juntamente com os extratos de plantas medicinais. Após incubação por 18 horas a 35 °C, determinou-se a concentração mínima capaz de produzir a completa supressão das colônias.

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO, KANEKO, OHARA, 2003; COLLINS, 1995). O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos (SAHM, WASHINGTON II, 1991; THORNSBERRY, 1991). Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste; como controle negativo, o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (SAHM; WASHINGTON II, 1991).

Dois metodologias podem ser empregadas: macro e microdiluição. A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1,0 a 10,0 mL. Apresenta a desvantagem de ser laboriosa, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos, possibilitando pequeno número de réplicas (SAHM; WASHINGTON, 1991; ZGODA & PORTER, 2001). Ao contrário, o método de microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (COLLINS, 1995).

A atividade antifúngica de alguns óleos essenciais de Lauraceae determinando a CMI em microplacas de 96 poços foi investigada por Simie e colaboradores (SIMIÉ et al., 2004). Os óleos essenciais investigados foram dissolvidos em MS (Malt Agar) inoculado com fungos. As microplacas foram incubadas a 28°C por 72 horas. As menores concentrações sem crescimento aparente foram definidas como as concentrações que inibem completamente o crescimento de fungos.

Karaman e colaboradores (2003) utilizaram a técnica para verificar a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *J. oxycedrus* dissolvido em DMSO 10%, concentração de solvente que não inibe o crescimento dos microrganismos. A técnica descrita foi adaptada por Zogda e Porter (2001), dispensando-se 95 µL de caldo nutriente e 5 µL de inóculo em cada poço. No primeiro foram então adicionados 100 µL de extrato de *J. oxycedrus* preparado inicialmente na

concentração de 500 µg/mL. Fez-se então uma diluição seriada nos 6 poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração, resultando na diluição de até 7,8 µg/mL. No último poço não se adicionaram o inóculo e o extrato, a fim de se ter um controle negativo. O crescimento microbiano foi determinado por leitura no espectrofotômetro a 600 nm.

A determinação da atividade antimicrobiana de cinco plantas nativas da Austrália foi analisada em microplacas, para utilização na indústria de alimentos, podendo promover maior segurança durante o prazo de validade dos mesmos (DUPONT et al., 2006).

A avaliação da atividade antimicrobiana de *Barringtonia acutangula* contra bactérias e fungos utilizou a técnica de microdiluição e, como revelador, a solução indicadora resazurina 750 µg/mL. A atividade foi avaliada observando a mudança de coloração de rosa para azul da cultura em microplacas (RAHMAN et al., 2005).

A atividade antimicrobiana também foi avaliada por microdiluição por Suffredini e colaboradores (2004), pretendendo desvendar propriedades farmacológicas de plantas nativas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica do Brasil. Os resultados foram determinados visualmente, de acordo com a turbidez provocada nos poços da microplaca.

Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Ainda, compostos presentes em alguns extratos precipitavam e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. Todavia, concluiu que o método de microplacas é robusto, barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requer pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente.

3. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi a avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, dos seus componentes majoritários e do extrato hidroalcoólico liofilizado das partes aéreas da *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling.

4. Material e métodos

4.1. Material

Para a preparação do extrato e do óleo essencial utilizaram-se as partes aéreas da *M. setosa*, que foram coletadas antes da época do florescimento nas primeiras horas do dia, na localidade de Taray, próximo (50,5 Km) à cidade de Cusco – Peru, à altitude de 2.928 metros. A espécie foi identificada pelo biólogo Justo Mantilla, no Instituto de Ecologia e Plantas Medicinais IEPLAM - Peru, e depositada no Herbário do Instituto de Botânica do Jardim botânico do Estado de São Paulo, sob o número Pinto 001.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo da planta

As partes aéreas da planta foram secadas à temperatura ambiente por sete dias, trituradas em moinho de faca (Grindomix GM 200), tamizadas em tamis número 21 e acondicionadas em frasco de vidro âmbar, para posterior uso da droga na extração hidroalcoólica. Para a extração do óleo essencial, utilizaram-se as partes aéreas frescas obtidas da colheita como mencionada no item 4.1.

4.2.2. Obtenção do extrato liofilizado

Para a obtenção do extrato liofilizado, preparou-se inicialmente o extrato fluido com solvente hidroalcoólico a 70% das partes aéreas da *M. setosa*, de acordo com o método C ou percolação fracionada da Farm. Bras II (FARMACOPOEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL 2ª Edição, 1959).

Após obtenção do extrato fluido, o etanol foi eliminado por evaporação a 40 °C no rotaevaporador (Rotavapor R-114 BÜCHI), durante três horas. Procedeu-se a liofilização, utilizando o liofilizador Edwards, modelo L4 KR, temperatura de congelamento de -40°C e pressão reduzida de 0,1 mbar, por 48 horas. O rendimento do extrato seco foi de 12,8% em relação à droga. Posteriormente, o extrato seco foi acondicionado em frascos de vidro âmbar e mantido em dessecador sob vácuo, do qual foi retirada a amostra para o ensaio microbiológico. Pesaram-se 25 mg do liofilizado que foram diluídos em 1,0 mL de solução (1:1) de dimetilsulfóxido e metanol (DMSO:MeOH), considerada a solução concentrada. No ensaio utilizou-se a concentração de 1,25 mg/mL.

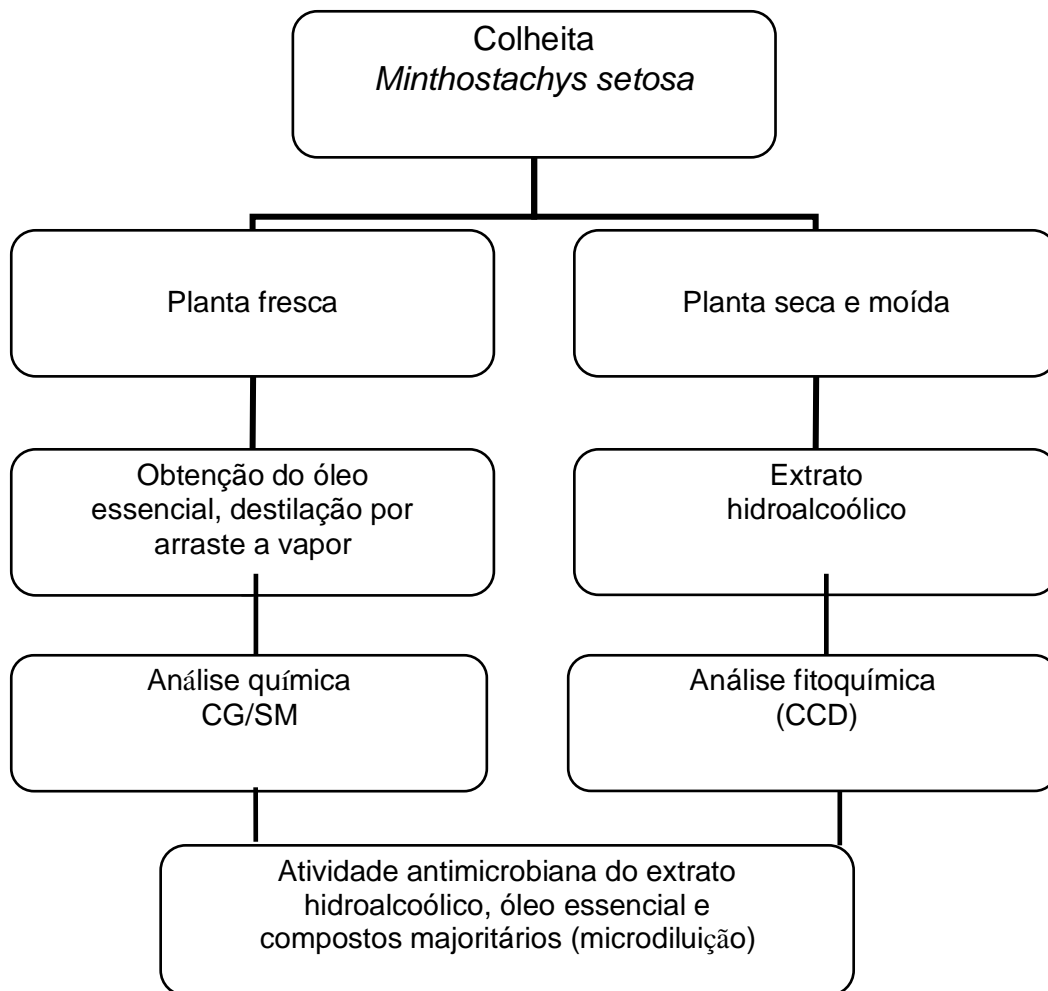


Figura 8 - Fluxograma dos experimentos

4.2.3. Análise cromatográfica em camada delgada do extrato liofilizado e suas frações

O extrato hidoalcóolico e seu liofilizado foram analisados por cromatografia em camada delgada, empregando-se os sistemas cromatográficos sugeridos por Wagner e Bladt (1996), que são descritos a seguir:

Sistema (A) – Fase móvel contendo tolueno:acetato de etila (93:7); substância de referência foi Mentol a 10% (p/v) em metanol; revelador: anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100 °C; amostra a 2 mg/mL.

Sistema (B) – Fase móvel contendo acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26); substâncias de referência, a Rutina e a Quercetina, ambas a 10% (p/v) em metanol; revelador luz UV 254/365 nm e Np; amostra a 2 mg/mL.

Sistema (C) – Fase móvel contendo clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico (5:4:1); substância de referência, ácido gálico 1mg/mL; revelador cloreto férrico a 25%(p/v) em metanol; amostra a 2 mg/mL.

A fase estacionária foi sílica gel 60 (Merck), preparada em placa de vidro de 4 x 8 cm com 0,3 mm de espessura para sistemas A, B e C.

4.2.4. Obtenção do óleo essencial

A extração do óleo essencial *M. setosa* (Briq.) foi realizada por destilação por arraste a vapor, de acordo com a Farmacopeia Europeia (1975). Foram pesados 15 quilogramas de partes aéreas da planta fresca, preparadas e colocadas em destilador industrial. O tempo de obtenção da fração volátil foi de aproximadamente três horas. O óleo essencial obtido foi armazenado em frascos âmbar para preservá-los da luz e do ar. Na Figura 5 pode ser visto o esquema utilizado para destilação de óleo. A matéria-prima (folhas) contendo óleo a ser extraído foi colocada no destilador que continha o fundo coberto com tela de aço inox, por onde passou o vapor. O

material destilado foi então separado (CINIGLIO, 1993) e posteriormente o óleo essencial foi estocado, à temperatura de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, em frascos de vidro âmbar, para evitar sua degradação pela luz e pelo ar.

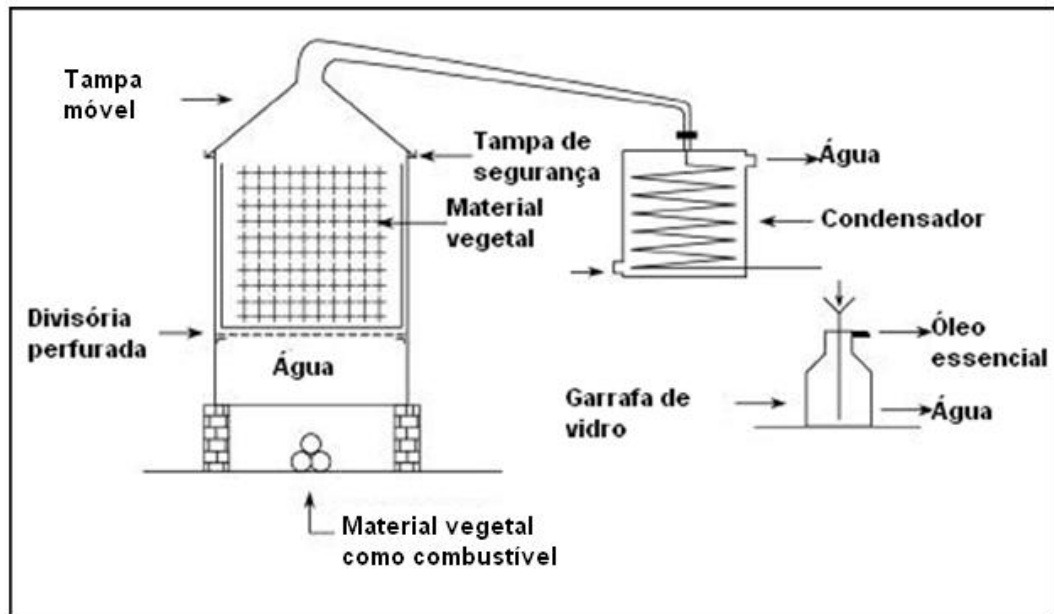


Figura 9- Esquema de um conjunto destilador para óleos essenciais. (Adaptado de BANDONI, 2002, 148p)

4.2.5. Características organolépticas e propriedades físico-químicas do óleo essencial

4.2.5.1. Características organolépticas

Analisaram-se as características de aspecto, de cor, de sabor e de odor.

4.2.5.2. Determinação da densidade relativa

Para o cálculo da densidade relativa do óleo essencial aplicou-se a fórmula da densidade ($d = m/v$), fixando-se um volume constante de óleo essencial (1 mL) e determinando-se a massas à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A razão entre a massas do óleo e o volume constante da amostra, em g/mL, foi determinada em balança analítica seguindo o método descrito no Instituto Adolfo Lutz (1985).

4.2.5.3. Determinação do índice de refração

A determinação do índice de refração foi realizada diretamente em refratômetro de Abbé (modelo RL1-PZO, Warszawa, Polônia). Com um capilar foram colocadas duas gotas do óleo no refratômetro equipado com termômetro. Com o ajuste do equipamento às condições experimentais, temperatura do óleo e ambiente a 20 °C, foram fechados os prismas que compõem o instrumento e realizadas as leituras pela escala do aparelho.

4.2.5.4. Solubilidade

Para a determinação da solubilidade foi empregado álcool etílico 96° e Dimetilsulfoxido:Metanol (50:50) (FUERTES; MUNGUÍA, 2001).

4.2.6. Determinação da composição do óleo essencial por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/SM)

Para a análise, o óleo volátil obtido por hidrodestilação foi diluído em acetona p.a., Merck, na razão de 1:100 (V/V). A seguir, foi injetado ,1,0 µL da amostra diluída que foi quantificada por cromatografia a gás com detector de ionização de chamas (CG-DIC) em um cromatógrafo Varian® (modelo CP 3380), com coluna DB-5 (30 m x 25 µm x 0,25 µm) e os componentes identificados por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) em um cromatógrafo Agilent® (série 6890) acoplado a um espectrômetro de massas com sistema quadrupolo (Agilent® 5973 *Network Mass Selective Detector*) em uma coluna HP-5MS (30 m x 25 µm x 0,25 µm) e utilizou-se a metodologia descrita por Adams (2007). O injetor (com divisão de fluxo - *split/splitless*) foi programado a 250 °C (razão de divisão 1:20) com temperatura inicial de 40 °C e final de 240 °C com aumento de 3 °C/min (tempo total de análise 80 min). O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80

Kpa e velocidade linear de 1 mL por minuto. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente.

A identificação dos componentes do óleo foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas com amostras autênticas e dados retirados da literatura (ADAMS, 2007) ou, ainda, por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados (Wiley, 275).

A fim de permitir uma comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos obtidos com os dados da literatura, amostras autênticas e banco de dados, foi utilizado o índice de retenção de Kováts. Esse utiliza uma série de alcanos saturados de cadeia normal (C5 a C29), para evitar erros devidos a variações do tempo de retenção dos compostos decorrentes de alterações como temperatura, fluxo e operador. O índice de retenção corrigido varia muito pouco e de maneira linear com a temperatura. Os índices de retenção calculados foram, então, comparados com os da literatura ou com amostras autênticas (SANDRA & BICCHI, 1987; COLLINS & BRAGA, 1988). O índice de retenção foi obtido por meio da seguinte equação:

Equação 1 - Para obtenção do índice de Kovast

$$I = \frac{100z + 100(\log t'RX - \log t'RZ)}{(\log t'R(Z+1) - \log t'RZ)}$$

Onde:

I = índice de Kovast.

z = número de átomos de carbono com menor peso molecular.

t'RX = tempo de retenção do composto x, sendo que t'RX é intermediário a t'RZ e t'R(Z+1).

t'RZ e t'R(Z+1) = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

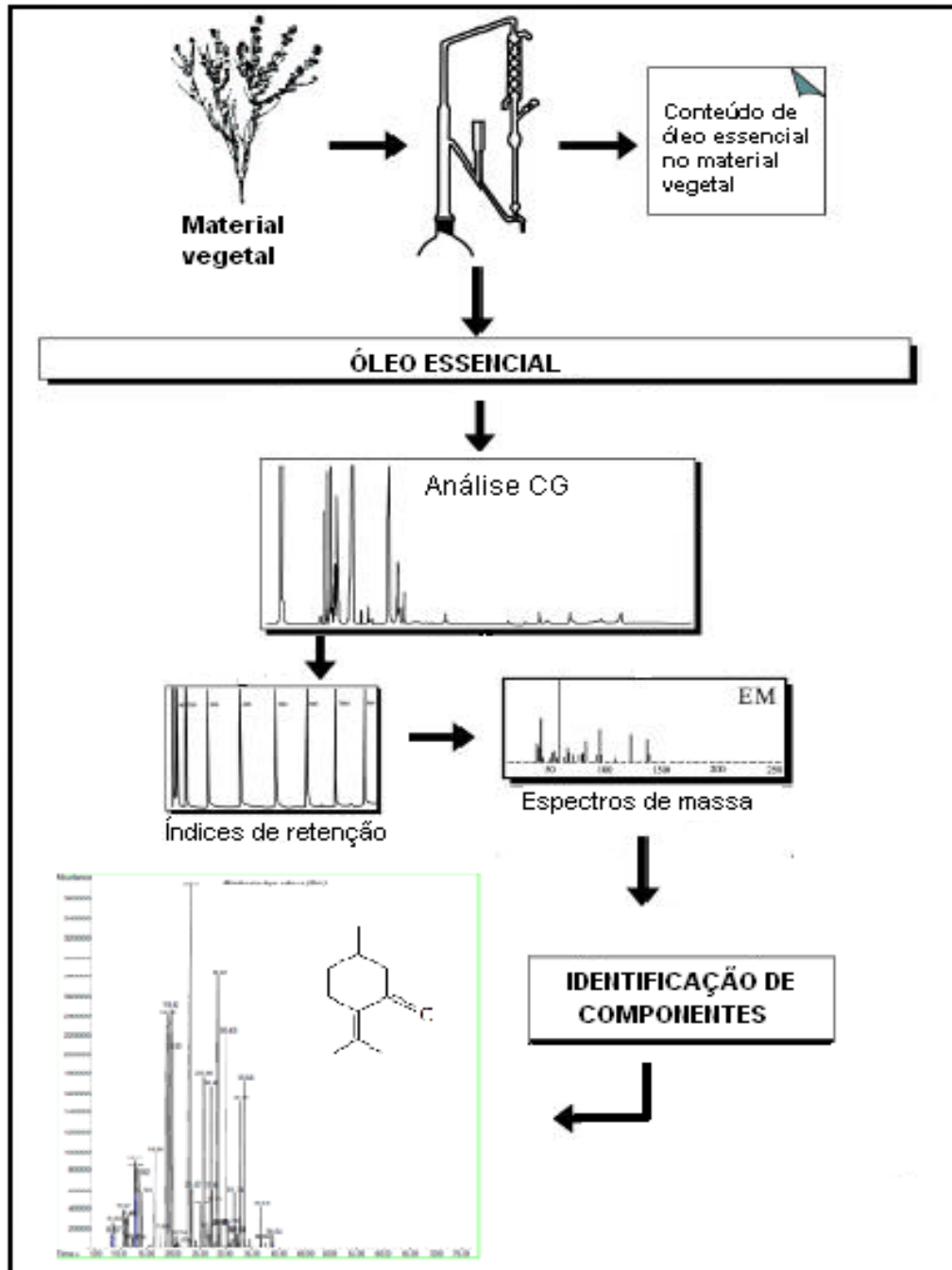


Figura 10 - Análise para a identificação dos componentes do óleo essencial da *M. setosa* (Adaptado de BANDONI, 2002, 207p)

4.2.7. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato, do óleo essencial e dos seus componentes majoritários

4.2.7.1. Microrganismo testado

Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus niger* ATCC 16404.

4.2.7.2. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados foram caldo e ágar de caseína soja (TSB e TSA) e caldo e agar *Sabouraud* Dextrose a 4% (p/p) (SDB e SDA), preparados de acordo com as instruções do fabricante (Difco®).

4.2.7.3. Preparação e avaliação da viabilidade do inoculo

A partir de culturas estoques, as bactérias foram repicadas em estrias na superfície do ágar inclinado com caseína de soja e incubadas a 35-37 °C por 24 horas. A *Candida albicans* foi repicada em SDA e incubada a 20-25 °C por 48 horas. Para o caso de *A. niger* foram necessários três tubos repicados em SDA e incubados a 20-25 °C por sete dias. A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em 9 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) e a suspensão obtida foi padronizada através de diluições decimais seriadas. Para recolher o *A. niger* utilizou-se também Polissorbato 80 a 1% (p/v) na solução salina. A partir da suspensão padronizada de cada microrganismo, foram efetuadas as diluições necessárias com

solução salina estéril para se obter concentração de 10^5 UFC/mL, para bactérias, e 10^3 a 10^4 UFC/mL para fungos. No final de cada experimento foi feito o plaqueamento da diluição microbiana para confirmação da viabilidade do inóculo.

4.2.7.4. Controle positivo

Solução de 1 mg/mL do padrão secundário de cloranfenicol (100.000 UI/mL), ou amicacina (916 µg/mg) ou nistatina (100.000 UI/mL) foi preparada, dependendo do microrganismo desafiado. Para cada controle positivo tomou-se 10µL dessa solução para que a concentração final fosse de 0,05 mg/mL em cada réplica.

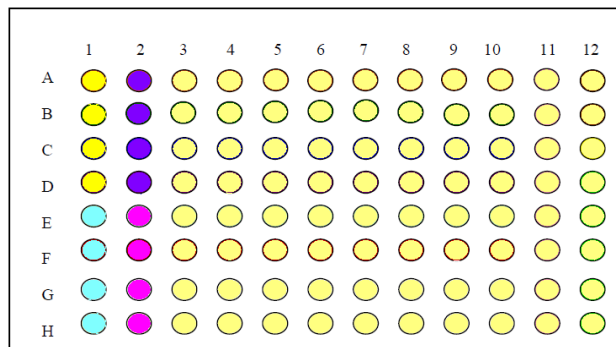
4.2.7.5. Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 µL. As duas primeiras colunas da microplaca foram utilizadas para os controles, que foram: 200 µL de TSB ou SDB (controle do meio de cultura); 190 µL de meio de cultura e 10 µL de solvente (DMSO:MeOH 50:50) (controle do solvente); 200 µL de meio de cultura inoculado com o microrganismo teste (controle de crescimento); 10 µL da solução de antibiótico e 190 µL de meio de cultura inoculado com o microrganismo em estudo (controle positivo ou de atividade antimicrobiana). As colunas restantes foram destinadas ao ensaio propriamente dito, sendo uma coluna para o controle do extrato (extrato e meio de cultura não inoculado); e as demais para as amostras (10 µL da amostra e 190 µL de meio TSB ou SDB inoculado), como descritas na Figura 11. No caso do óleo essencial não se realizaram os controles pela ausência de cor do mesmo. Após incubação de 24 horas a 35 °C, para bactérias, ou 48 horas a 25

°C, para fungos, foram realizadas as leituras a 630 nm utilizando-se o leitor de microplacas (detector de ELISA).

Para o *A. niger* o ensaio foi semelhante, no entanto com incubação por 72 horas a 25 °C e não foi realizada a leitura no leitor de microplaca. A determinação foi qualitativa, considerando presença ou ausência de crescimento e pela contagem de microrganismos em UFC/mL.

Para cada microrganismo em teste, foram realizadas no mínimo três réplicas, com três repetições consecutivas e os resultados foram analisados estatisticamente.



● Controle do meio ● Controle do antibiótico ● Controle de crescimento

● Controle do solvente ● óleo essencial com inóculo em diferentes concentrações

Figura 11 - Distribuição da microplaca utilizada para determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial, pulegona mentona e extrato liofilizado da *Minthostachys setosa* frente a diferentes microrganismos

5. Resultados e Discussão

Com intuito de analisar os componentes dos extratos fluído e liofilizado das partes aéreas da *M. setosa* (Briq.) realizou-se a análise fitoquímica. Os resultados da cromatografia de camada delgada (CCD) foram importantes para revelar a presença ou a ausência de óleos essenciais, flavonoides e taninos, pois tais componentes poderiam ser responsáveis pela atividade antimicrobiana. Como substância de referência, para cada classe de princípio ativo, utilizou-se a pulegona, ou a rutina, ou a quercetina ou o ácido gálico, conforme o item 4.2.3.

Os resultados demonstraram que, por meio da aplicação do sistema A, não foi possível detectar a presença da pulegona, indicando o processo de extração por percolação, no qual se utiliza a planta seca, não mantém os óleos essenciais em níveis adequados (Tabela 1). Assim, quando da extração de óleo essencial sugere-se que o mais recomendado é a utilização da planta fresca.

No sistema B, específico para flavonoides, não foi detectada a rutina no extrato hidroalcolólico; entretanto, o liofilizado detectou presença, sugerindo que neste, por ser mais concentrado, foi possível a revelação. O mesmo comportamento foi observado quando da utilização do sistema C, detecção de taninos, quando se verificou maior presença do ácido gálico no extrato liofilizado, como pode se observar na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos fluído e liofilizado de *Minthostachys setosa* em diferentes fases móveis (sistemas).

Sistemas	Amostra	Rf	Sustância de referência
Sistema (A)	Extrato fluído	-	Não detectado
	Extrato liofilizado	-	Não detectado
Sistema (B)	Extrato fluído	-	Não detectado
	Extrato liofilizado	36,6	Detectado
Sistema (C)	Extrato fluído	27,5	Detectado
	Extrato liofilizado	27,5	Detectado

Rf = Distância de migração da substância/distância percorrida pela fase móvel (x100); - não apresenta; Sistema (A) = tolueno-acetato de etila (93:7); Sistema (B) = acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial, água (100:11:11:26); e Sistema (C) = clorofórmio, acetato de etila, ácido fórmico (5:4:1); Fase estacionária utilizada para os três sistemas foi a sílica gel 60G.

A atividade antimicrobiana do extrato liofilizado da *M. setosa* frente aos microrganismos, utilizados na avaliação da qualidade microbiana de produtos farmacêuticos (U.S.P. Pharmacopoeia, 2009; European Pharmacopoeia, 2007) e cosméticos (CTFA. 2001), foi verificado pelo método de microdiluição, de acordo com o item 4.2.7. Este requereu quantidades mínimas de amostra a ser analisada, vantagem que propicia análise quando se tem baixo rendimento na extração. Além disso, há a possibilidade de utilizar mais réplicas, tornando o método mais preciso e diminuindo-se o custo (ELOFFT, 1998).

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento dos microrganismos em relação ao controle positivo (antibiótico). A leitura da turbidez do crescimento da população microbiana dos microrganismos frente *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* é mostrada na Tabela 2 e na Figura 12. Em relação ao *A. niger*, a análise foi qualitativa devido à característica deste microrganismo não apresentar crescimento homogêneo, dificultando a leitura em absorbância.

Tabela 2 - Porcentagem de inibição do extrato liofilizado da *Minthostachys setosa* em comparação com antibiótico (1mg/mL) frente *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 a 10^5 UFC/mL e *Candida albicans* ATCC 10231 a 10^4 UFC/mL.

Amostras e controles	% de inibição do extrato liofilizado			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
C (+)	100 ^a	100 ^a	100 ^b	94,07 ^c
D/M	6,62	13,00	7,24	1,55
EL 1,25 mg/mL	61,16	57,70	46,32	38,98

EL= Extrato liofilizado 1,25 mg/ml; C(+) = Antibiótico 1 mg/mL; D/M = Solvente do extrato liofilizado DMSO:MeOH (1:1); ^a Cloranfenicol; ^b Amicacina; ^c Nistatina

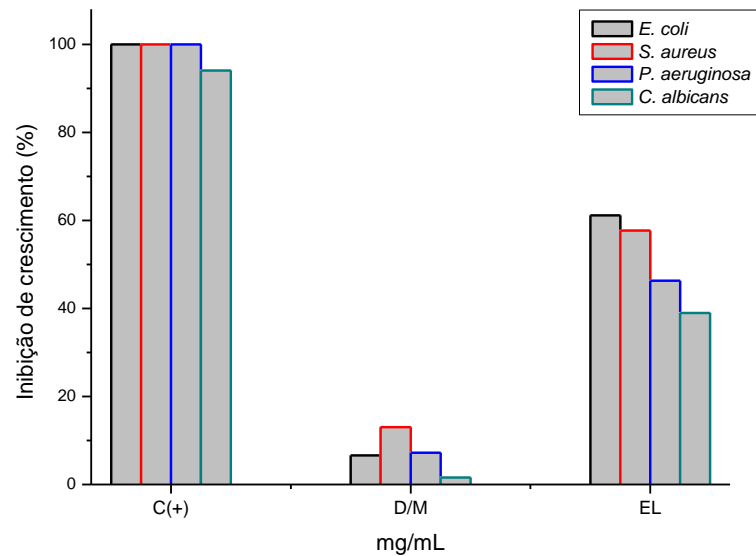


Figura 12 - Inibição do extrato da *Minthostachys setosa* em comparação com antibiótico 1mg/mL frente *Escherichia coli* 10^5 UFC/mL ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 10^5 UFC/mL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 10^5 UFC/mL e *Candida albicans* ATCC 10231 10^4 UFC/mL. C(+) = Antibiótico 1 mg/mL; D/M = Solvente do extrato liofilizado DMSO:MeOH (1:1); EL= Extrato liofilizado 1,25 mg/mL

Os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana do extrato liofilizado a 1,25 mg/mL foi maior para *E. coli* (61,16 % de inibição do crescimento do microrganismo desafiado) e *S. aureus* (57,70 %) do que para *P. aeruginosa* (46,32 %), nas mesmas concentrações desafiantes de 10^5 UFC/mL. A carga microbiana de *C. albicans* desafiada foi a 10^4 UFC/mL e o extrato apresentou 38% de inibição do crescimento do microrganismo desafiado. Em relação ao *A. niger*, a carga desafiada foi de 10^3 UFC/mL, mas não houve inibição, mostrando crescimento em todos os poços. A concentração acima mencionada poderia ser aumentada para se obter resultados com melhor atividade, no entanto, nestas concentrações houve limitação da técnica quanto à leitura da absorbância. A atividade antimicrobiana do extrato liofilizado, apesar de concentrada, não demonstrou eficácia acima de 61% de inibição do crescimento do microrganismo desafiado.

Na literatura encontram-se pesquisas relacionando a utilização do óleo essencial do gênero *Minthostachys* com atividade antimicrobiana. De Feo (1998) analisou o conteúdo do óleo essencial da *M. verticillata* e avaliou a atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando sensibilidade frente ao óleo essencial. O mesmo gênero foi testado pelo método

difusão em ágar frente aos mesmos microrganismos, mostrando maior sensibilidade às bactérias Gram-negativas frente ao óleo essencial (PRIMO et al., 2001). O óleo essencial de *M. mollis* foi também avaliado frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando atividade significativa frente a *B. subtilis* e *S. typhi* (MORA et al., 2009). Pelos estudos realizados, a *M. setosa* poderia ser alvo importante de pesquisa, por apresentar as mesmas propriedades das espécies já estudadas.

Com essa perspectiva direcionou-se o trabalho na investigação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das partes aéreas da *M. setosa*, cujas características não foram ainda descritas. Para que o óleo essencial usado no experimento fosse padronizado foram realizadas as análises de caracterização. Adicionalmente, esses resultados poderiam ser usados para elaborar a especificação do óleo essencial, usado como referência, para o controle de qualidade. Os resultados das análises estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Características organolépticas e propriedades físico-químicas do óleo essencial da *Minthostachys setosa* (Briq.)

Características organolépticas	
Cor	Verde amarelada
Odor	Aromático agradável (semelhante ao mentol)
Sabor	Refrescante não persistente
Aspecto	Líquido fluido e transparente
Propriedades físico-químicas	
Densidade relativa (25 °C)	0,91178 g/mL
Índice de Refração (20 °C)	1,427
Solubilidade: solúvel (1:1) em etanol 95%	100 %
Solubilidade: solúvel (1:1) em DMSO:MeOH (50:50)	100 %

Em relação aos constituintes do óleo essencial de *M. setosa*, o pesquisador Senatore (1998) detectou a presença representativa de terpenos, sendo a pulegona e a mentona compostos majoritários (SENATORE,1998). Para comparar os resultados desse autor, a amostra do óleo essencial obtido, para a realização do presente trabalho, foi analisada quanto aos constituintes, de acordo com o item 4.2.6.

A análise da composição do óleo essencial detectou pelo menos 39 compostos, que foram determinados pelo cálculo do índice de Kovats e comparados com os espectros de massas dos padrões de igual índice de retenção encontrados na literatura (ADAMS, 2007). Os compostos majoritários encontrados foram também a pulegona 28,6% (Figura 14) e a mentona 12,6% (Figura 15), como mostram a Tabela 4 e a Figura 13. Comparando-se com o estudo realizado por Senatore (SENATORE, 1998), que encontrou 50 compostos, o óleo essencial analisado no presente trabalho apresentou menor número, entretanto os mesmos compostos majoritários com teores menores. Tais diferenças provavelmente se devem à condição de obtenção, assim como área e época de cultivo, pois a planta estudada foi colhida próximo de Lima, que se encontra ao nível do mar. Nesse estudo, a planta foi cultivada em Taray, estado de Cusco, a 3.800 metros, apontando possível influência das condições de cultivo na extração do óleo essencial.

Tabela 4 - Composição química do óleo essencial da *Minthostachys setosa* (Briq.)

Composto	K.I.	Componente	Teor (%)
1	928	α -tujeno	0,4
2	932	α -pineno	1,2
3	974	Sabineno	1,3
4	990	Mirceno	1,0
5	995	octan-3-ol	1,1
6	1014	α -terpineno	0,3
7	1023	<i>Orto</i> -cimeno	2,6
8	1027	Limoneno	1,9
9	1039	(Z)- β -ocimeno	0,2
10	1050	(E)- β -ocimeno	1,6
11	1058	γ -terpineno	1,2
12	1104	Linalol	4,0
13	1127	acetato de 3-octila	0,6
14	1157	Mentona	12,6
15	1168	iso-mentona	11,0
16	1177	Iso-pulegona	5,8
17	1194	α -terpineol	0,3
18	1205	decan-3-ol	0,2
19	1249	Pulegona	28,6
20	1255	Piperitona	0,6
21	1290	Timol	0,5
22	1299	Carvacrol	2,6
23	1324	acetato de cis-piperitila	0,2
24	1333	δ -elemeno	2,1
25	1336	Piperitona	0,7
26	1351	acetato de timila	0,6
27	1372	acetato de carvacrila	5,6
28	1378	β -bourboneno	0,3
29	1386	β -elemeno	0,3
30	1413	E-cariofileno	4,0
31	1422	β -copaeno	3,0
32	1446	α -humuleno	0,6
33	1453	<i>alo</i> -aromadendreno	0,2
34	1456	6-Desmetoxi-ageratocromeno	0,2
35	1475	germacreno D	2,0
36	1490	biciclogermacreno	2,5
37	1570	espatulenol	0,5
38	1575	oxido de cariofileno	0,2
39	1619	2S,5E-cariofil-5-en-12-al	0,2

TR: tempo de retenção, IK: índice de Kovats

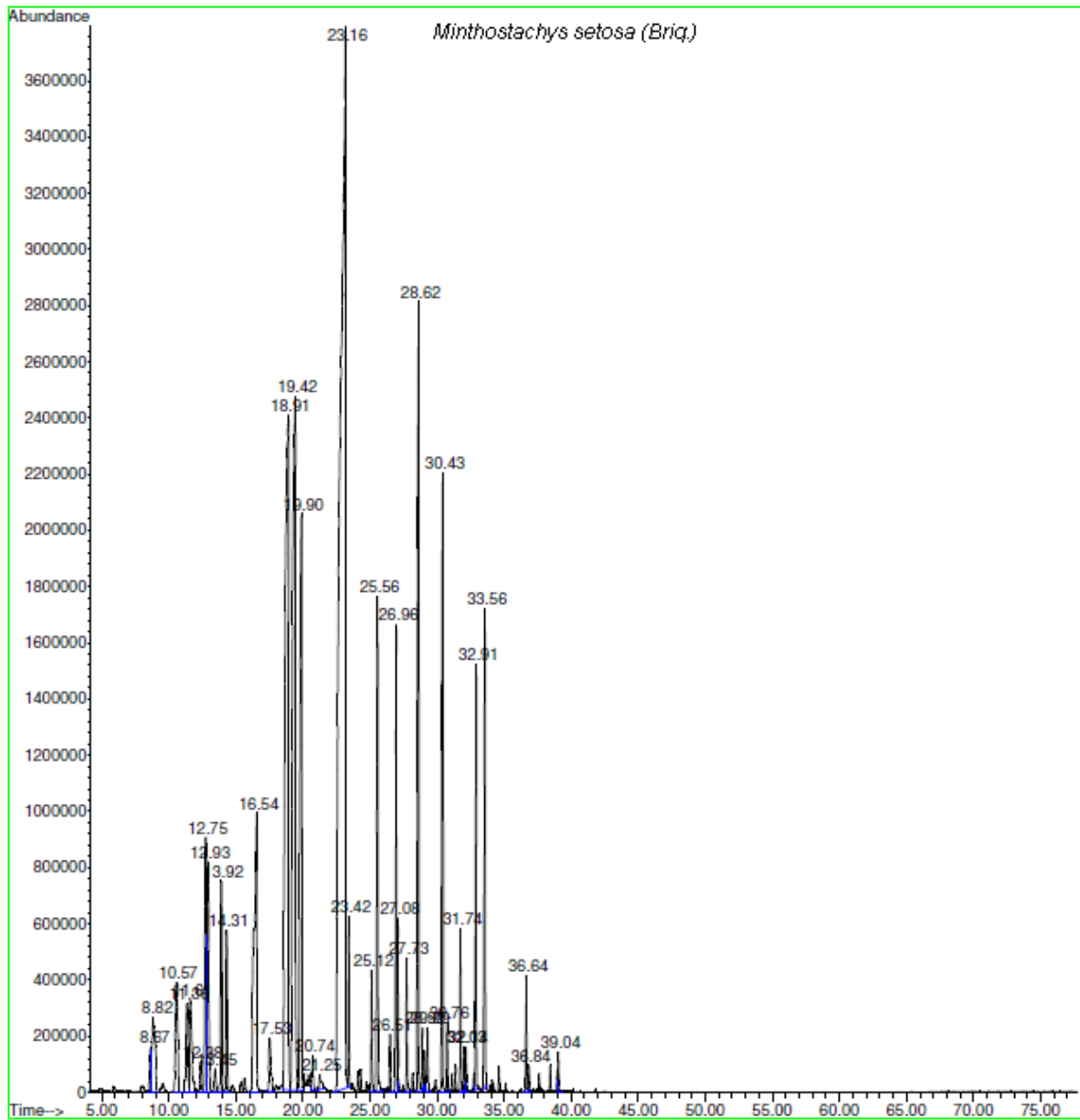


Figura 13 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Minthostachys setosa*

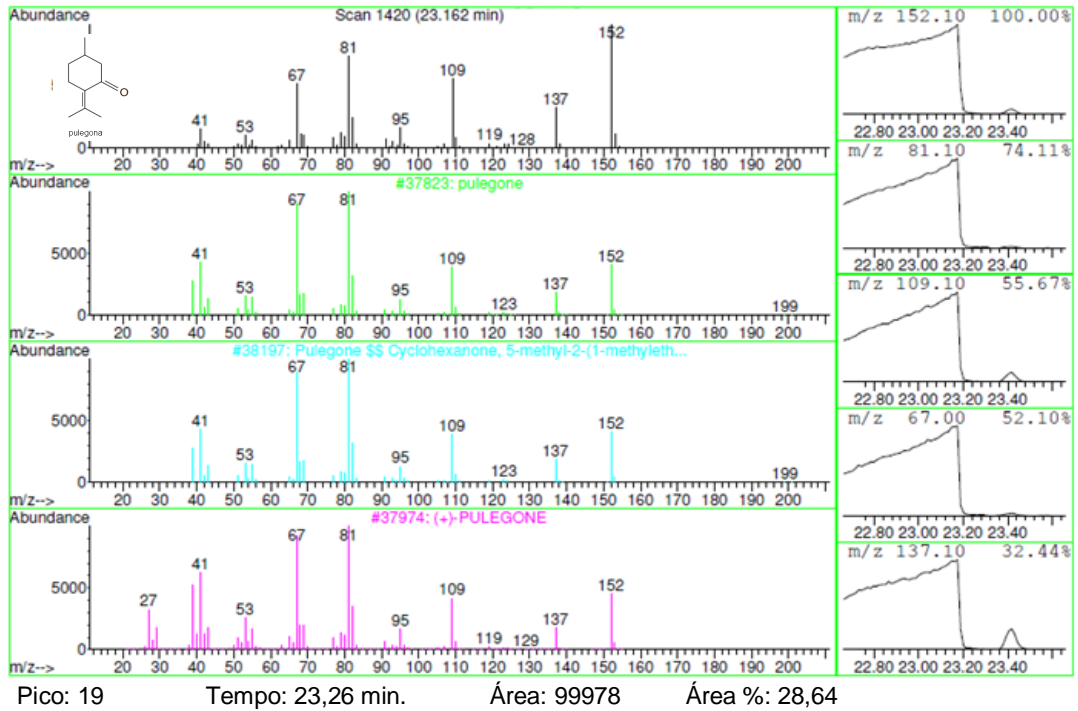


Figura 14 - Espectro de massas da pulegona comparados com bases de dados de Adams (2007) e Wiley 275

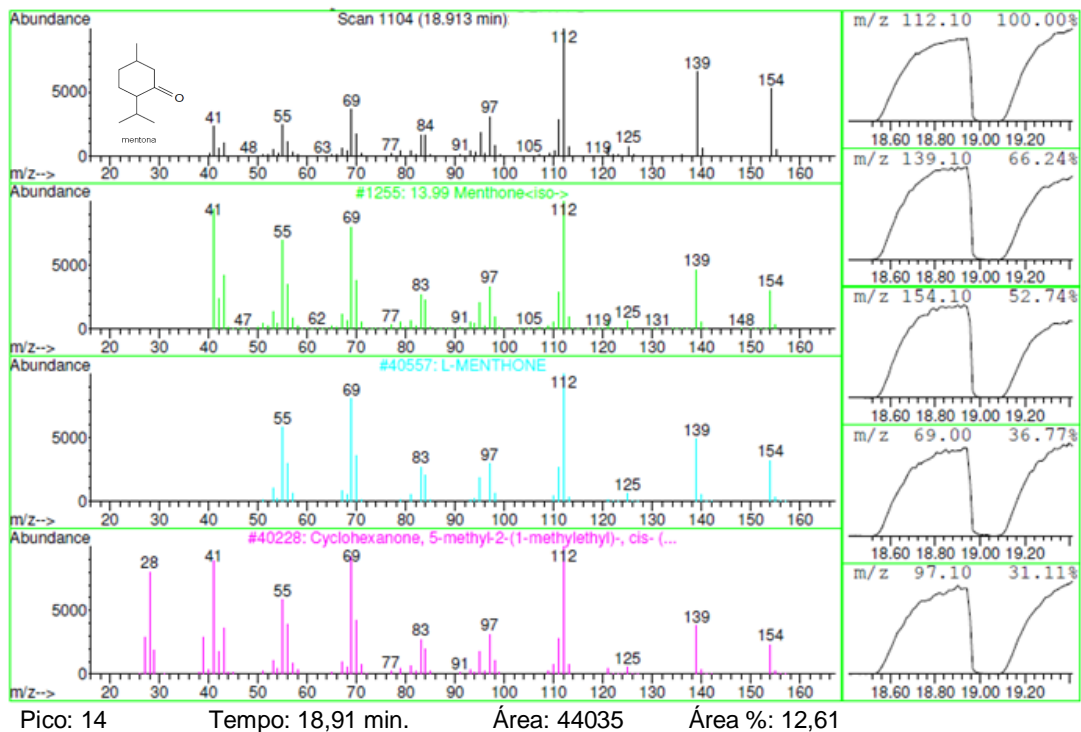


Figura 15 - Espectro de massas da mentona comparados com bases de dados de Adams (2007) e Wiley 275

Outros estudos da análise do óleo essencial da *Minthostachys* foram realizados com espécies diferentes; tais pesquisas mostraram conteúdos semelhantes em relação aos compostos majoritários do óleo estudado no presente trabalho. De Feo (1998) analisou o óleo da *M. verticillata* que apresentou teores de 37,8 e 29,2 % de pulegona e mentona, respectivamente. A mesma espécie foi analisada, mas os valores encontrados foram de 44,56 de pulegona e 39,51 % de mentona em sua composição (PRIMO et al., 2001). O óleo de *M. mollis* apresentou teores de pulegona e mentona de 55,2 e 31,5 %, respectivamente (MORA et al., 2009). Estes resultados confirmam outras pesquisas, que demonstraram que os terpenos são responsáveis pela atividade antibacteriana e antifúngica (KARAMAN et al., 2003; SAHIN, 2002; GULLUCE et al., 2007).

Pelo exposto e dando continuidade no presente trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana frente aos microrganismos nomeados no item 4.2.7.1., os quais foram desafiados frente a óleo essencial da *M. setosa* e seus componentes majoritários. Para cada microrganismo foi observado o comportamento durante o período de incubação específico, após a inoculação (t_1), e nos intervalos de tempo de 3 horas (t_3); 6 horas (t_6); 12 horas (t_{12}) e 24 (t_{24}) horas para bactérias. Para os fungos estendeu-se o tempo para 48 (t_{48}) e 72 (t_{72}) horas.

O comportamento observado da *E. coli*, com concentração inicial de 10^5 UFC/mL frente ao óleo essencial, Figura 16, e compostos majoritários, Figura 17, durante o período de incubação de 24 horas está apresentado em porcentagem de crescimento em relação a condição isenta de amostra. Observa-se na curva de crescimento do inoculo (controle do microrganismo desafiado), que o *lag time* apresentou-se a partir de três horas e a presença das amostras diminui o seu tempo de geração. Pelos resultados, houve inibição nas 24 horas pelo antibiótico na concentração de 50 µg/mL, pelo óleo essencial nas concentrações de 22,8, 11,4 e 5,8 µg/mL e pela pulegona nas concentrações 6,5 e 3,2 µg/mL. Evidenciando-se, assim, que tanto o óleo como a pulegona nessas concentrações apresentam atividade similar ao antibiótico de referência. No entanto, se observa que a mentona não inibiu o crescimento microbiano. Pela Figura 18 pode-se comparar o desempenho da atividade antimicrobiana do óleo essencial, da pulegona e da

mentona frente à *E. coli*, pela porcentagem de inibição de crescimento até período de 24 horas.

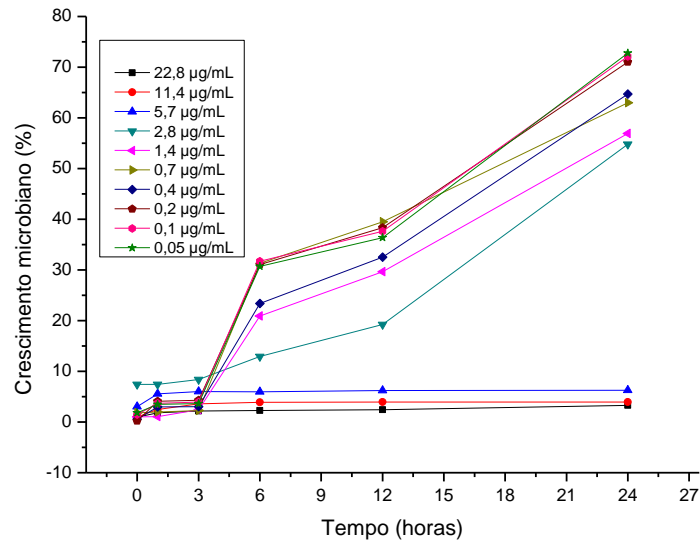


Figura 16 - Comportamento de *Escherichia coli* ATCC 8739 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de *Minthostachys setosa* durante 24 horas

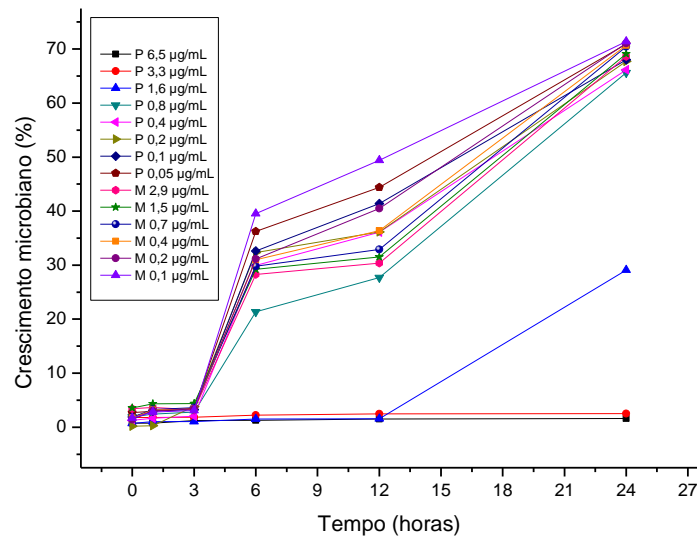


Figura 17 - Comportamento de *Escherichia coli* ATCC 8739 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona durante 24 horas. P= pulegona; M=mentona

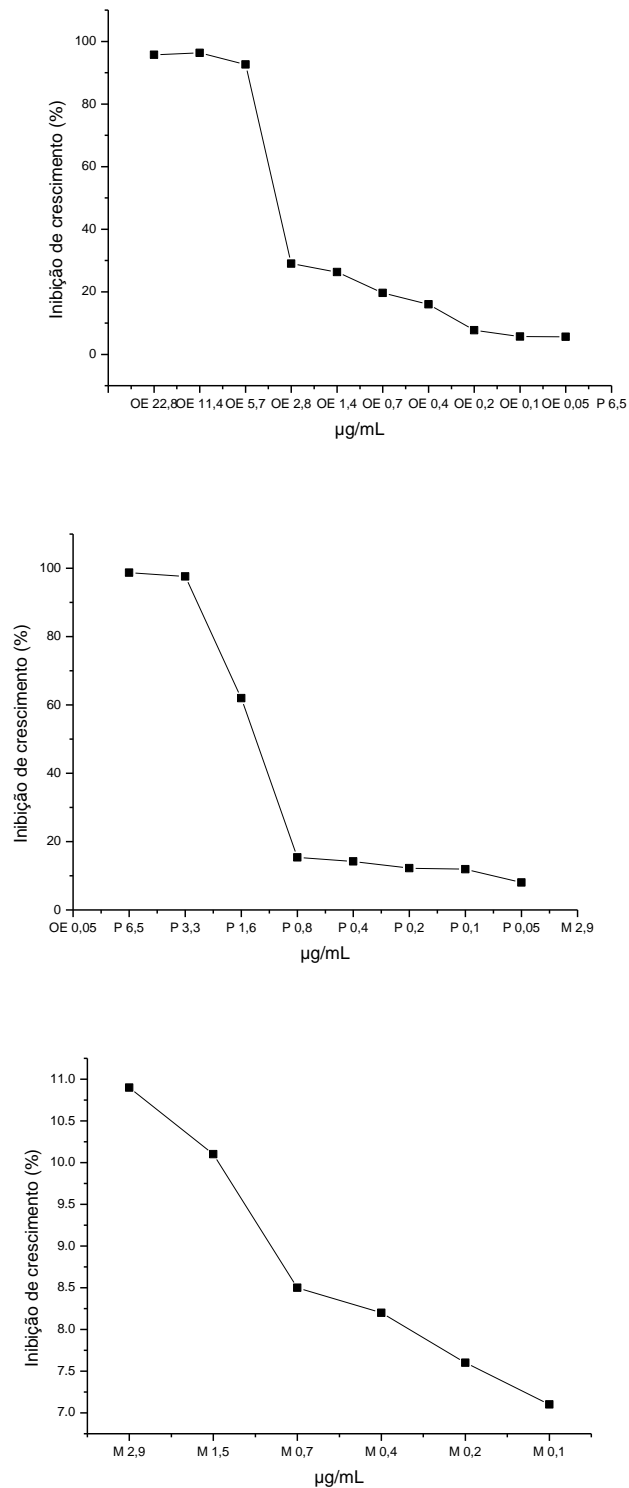


Figura 18 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial *M. setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Escherichia coli* ATCC 8739 10^5 UFC/mL após 24 horas de incubação; OE= óleo essencial; P= pulegona; M= mentona

O comportamento do *S. aureus* frente a diferentes concentrações do óleo e dos compostos majoritários (pulegona e mentona) é apresentado nas Figuras 19 e 20. Observa-se também na curva de crescimento do inoculo (controle do microrganismo desafiado), que a presença das amostras diminui o seu tempo de geração. Houve maior eficácia em relação à *E. coli* (Figura 16 e 17) após as três horas de incubação. Na Figura 21, gráfico da dose-resposta, verifica-se que a atividade tanto para o óleo essencial como para a pulegona matem o mesmo comportamento até 24 horas.

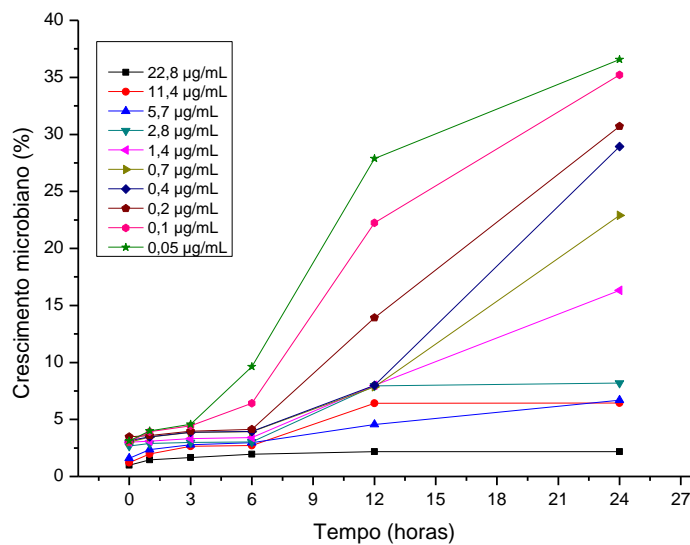


Figura 19 - Comportamento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de *Minthostachys setosa* durante 24 horas

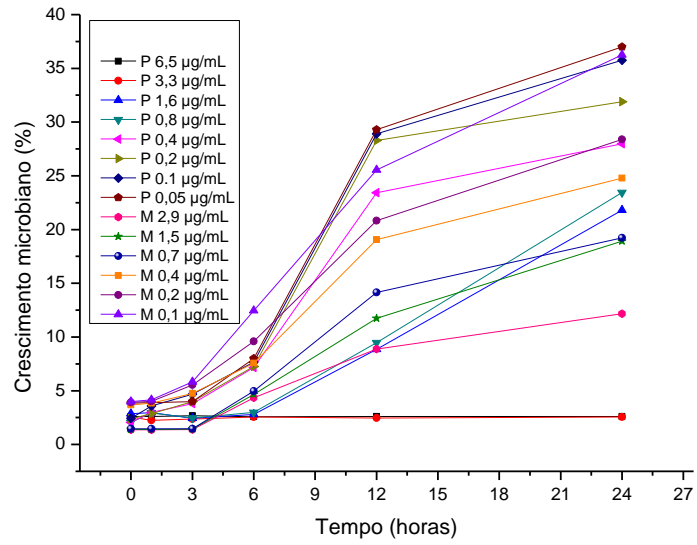


Figura 20 - Comportamento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 10^5 UFC/mL em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona durante 24 horas. P= pulegona; M=mentona

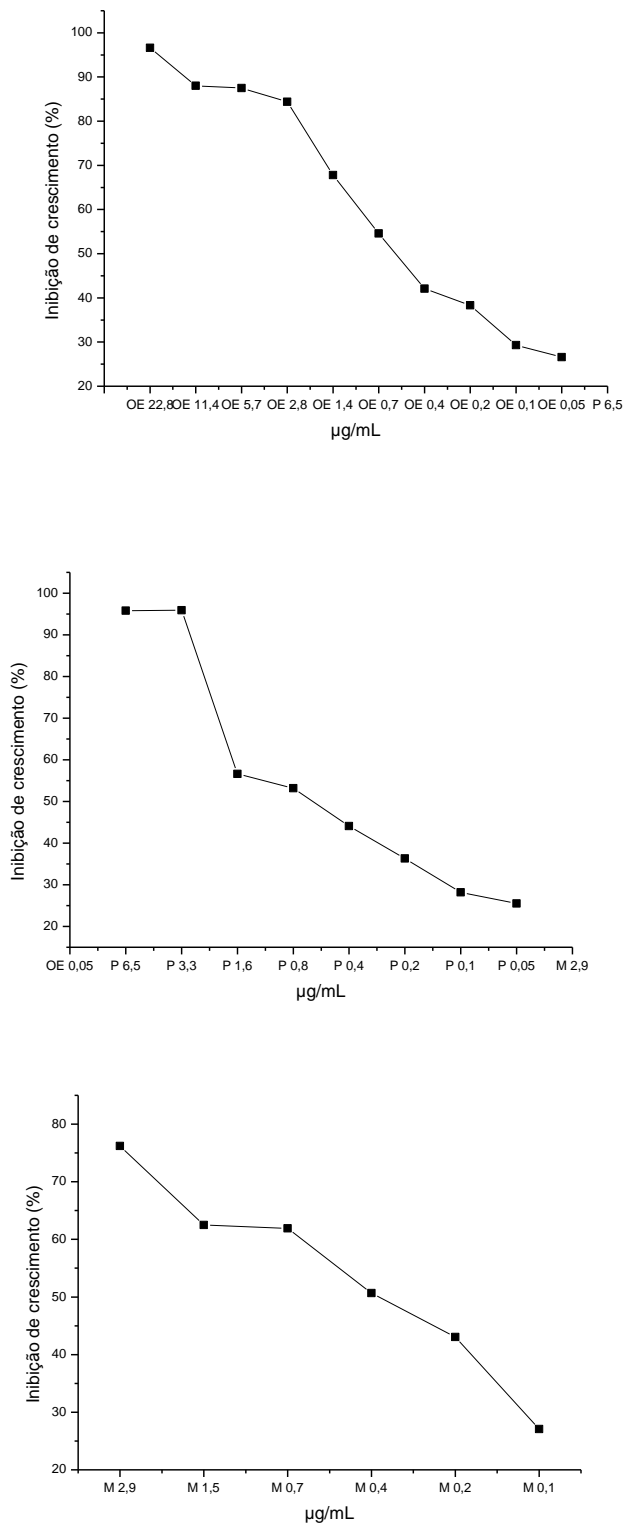


Figura 21 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial *M. setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 10^5 UFC/mL após 24 horas de incubação; OE= óleo essencial; P= pulegona; M= mentona

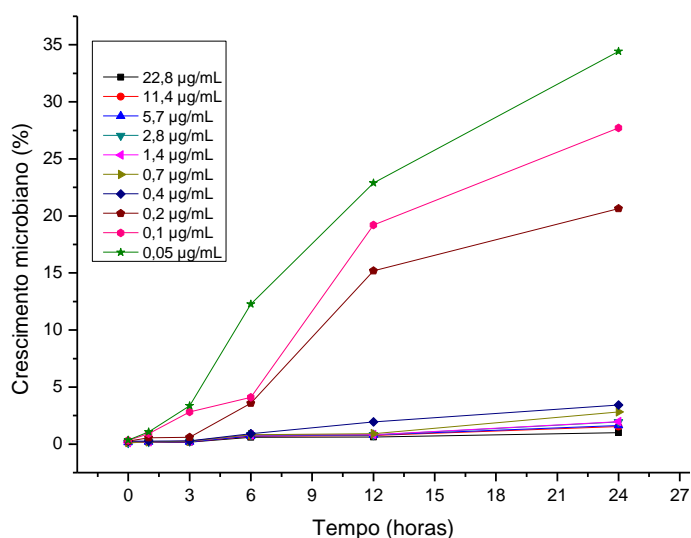


Figura 22 - Comportamento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de *Minthostachys setosa* durante 24 horas

A *P. aeruginosa* apresenta, também, crescimento somente após as 3 horas de incubação. Observa-se também na curva de crescimento do inóculo (controle do microrganismo desafiado), que a presença das amostras diminui o seu tempo de geração. Na Figuras 22 observa-se que o óleo essencial apresenta inibição nas concentrações entre 22,8 e 1,4 µg/mL até 24 horas de incubação. No caso da pulegona, a inibição de crescimento foi nas concentrações entre 6,5 e 0,8 µg/mL (Figura 23). Esses resultados mostram que a pulegona pode ser a principal responsável pela atividade do óleo, como apresentado na Figura 23, em porcentagem de inibição. Assim, sugere-se que a *P. aeruginosa* é a mais sensível, quando se compara com os outros microrganismos estudados. Na Figura 24, gráfico dose-resposta, é também possível verificar que o óleo essencial e a pulegona são os responsáveis pela atividade antimicrobiana.

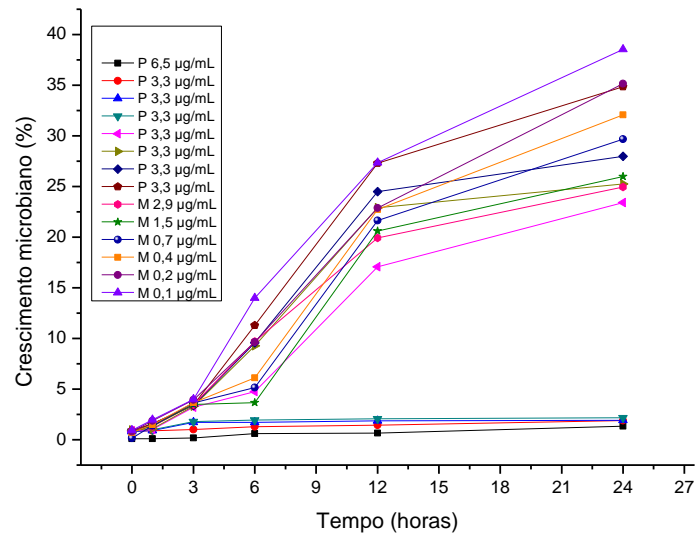


Figura 23 - Comportamento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona a diferentes concentrações durante 24 horas. P= pulegona; M=mentona

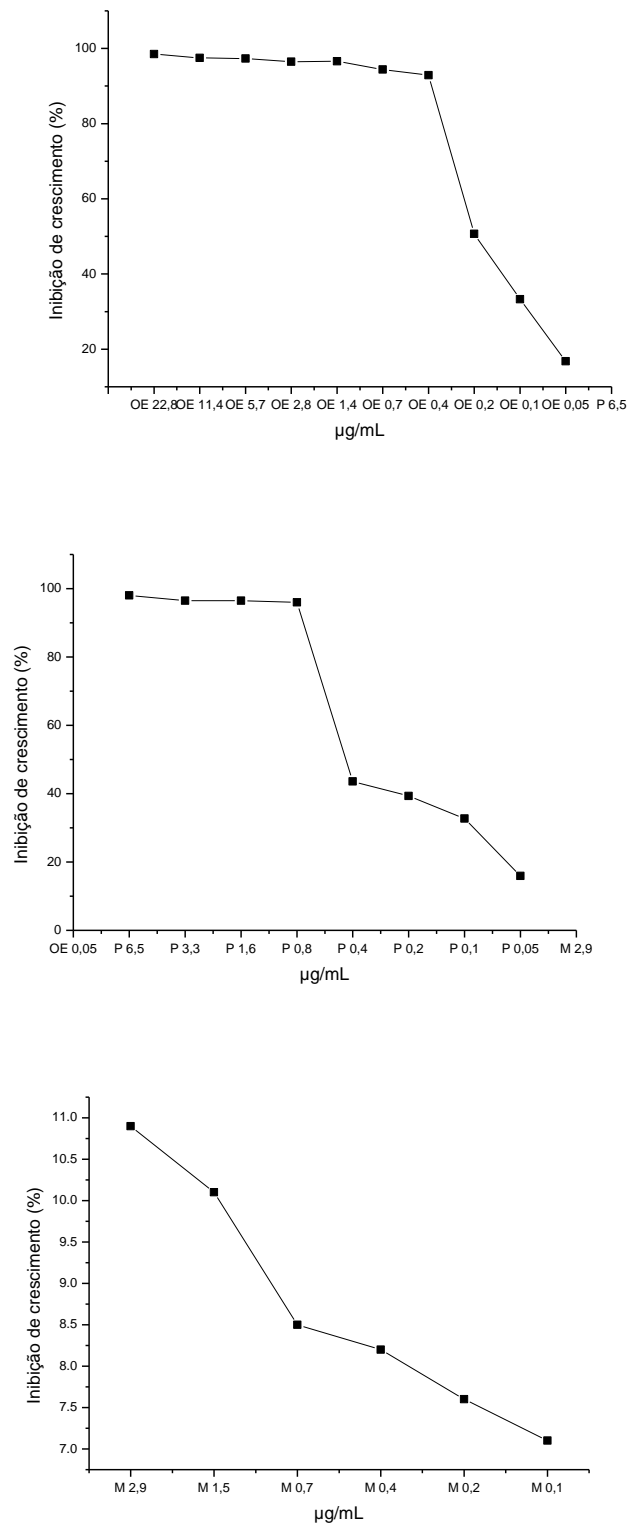


Figura 24 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial *M. setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 10^5 UFC/mL após 24 horas de incubação; OE= óleo essencial; P= pulegona; M= mentona

Nas Figuras 25 e 26 verifica-se que a *C. albicans* apresentou crescimento após 12 horas de incubação somente nos controles e na presença de quantidades menores que 5,7 µg/ml de óleo essencial e 1,6 µg/ml da pulegona. O crescimento microbiano até 48 horas não foi observado para as concentrações 22,8 µg/ml, 11,4 e 5,7 µg/mL do óleo essencial e 6,5; 3,3 e 1,6 µg/mL da pulegona. Esses resultados mostram que 5,7 mg/ml de óleo essencial e 1,6 µg/ml da pulegona podem ser considerados valores de CIM. A figura 27 ilustra de forma mais visível o comportamento das outras concentrações estudadas, por meio da porcentagem de inibição comparada com o óleo essencial, pulegona e mentona.

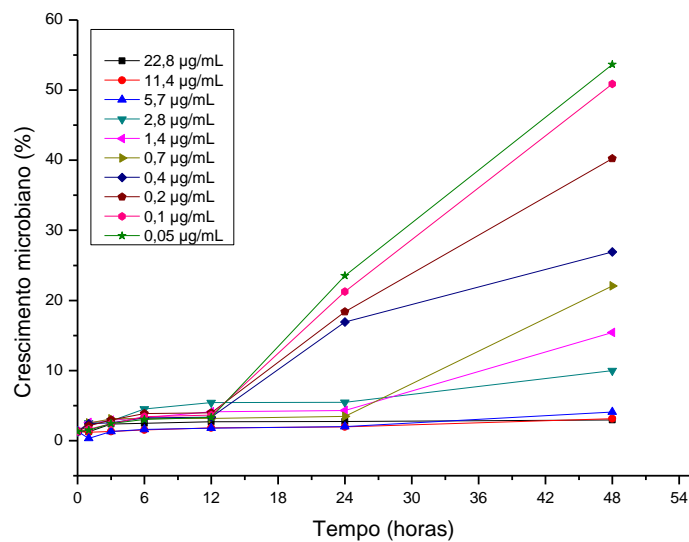


Figura 25 - Comportamento de *Candida albicans* ATCC 10203 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações do óleo essencial de *Minthostachys setosa* durante 24 horas

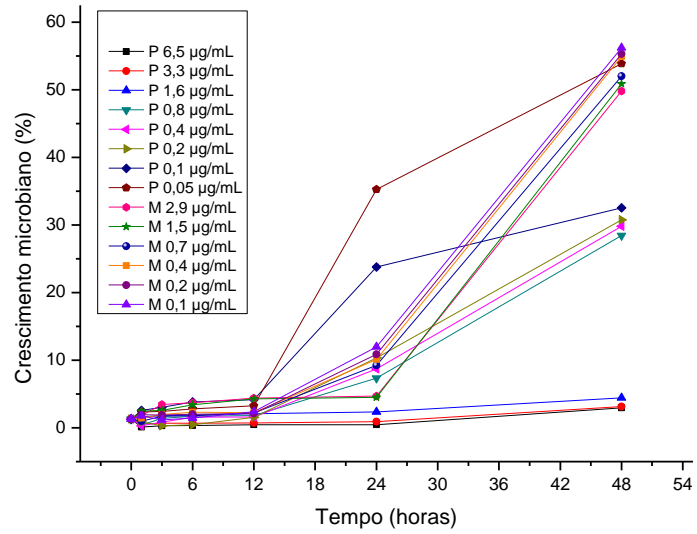


Figura 26 - Comportamento de *Candida albicans* ATCC 10203 em relação ao crescimento microbiano frente a diversas concentrações da pulegona e da mentona a diferentes concentrações durante 48 horas. P=pulegona; M=mentona

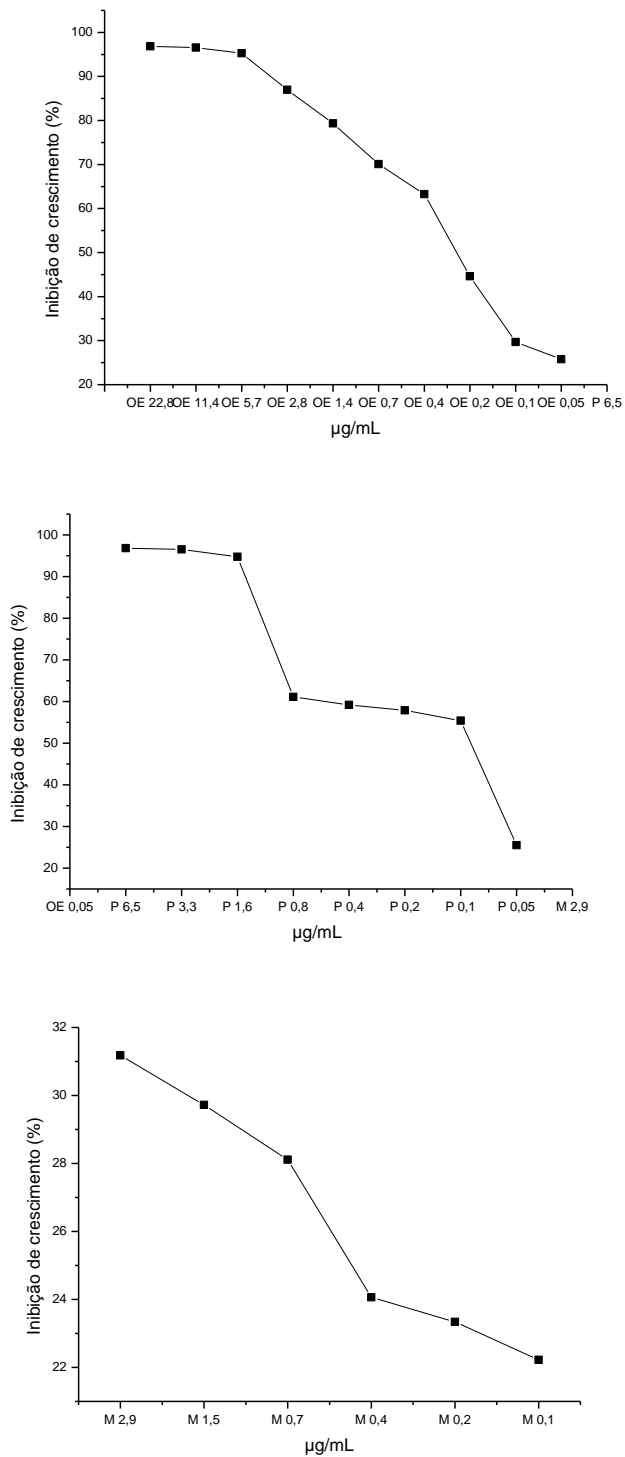
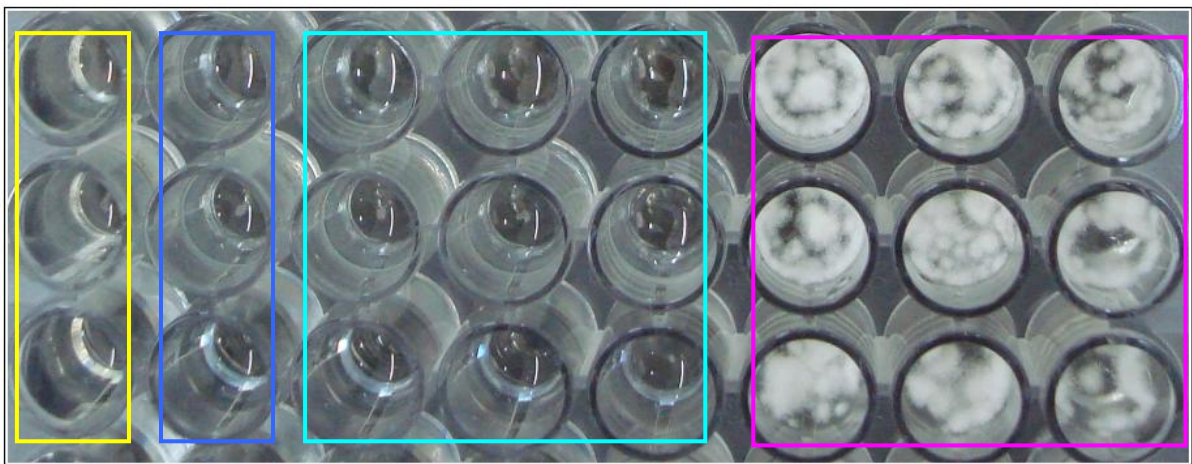


Figura 27 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial *M. setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Candida albicans* ATCC 10203 10^4 após 48 horas de incubação; OE= óleo essencial; P= pulegona; M= mentona

A Figura 28 apresenta a atividade antifúngica do óleo essencial (OE) e de seus componentes majoritários, cujos resultados foram determinados visualmente, de acordo com a turbidez provocada pelo crescimento do microrganismo nos poços da microplaca. Pode-se observar que o óleo essencial, nas concentrações entre 22,8 e 1,4 $\mu\text{g/mL}$, e a pulegona, na concentração de 6,5 $\mu\text{g/mL}$, inibem o crescimento de *A. niger*, verificando-se comportamento semelhante ao do antibiótico (Figura 29 e 30).



■ Antibiótico ■ Controle do meio ■ Atividade do OE ■ Crescimento microbiano

Figura 28 - Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial frente a *Aspergillus niger* a 10^3 UFC/mL

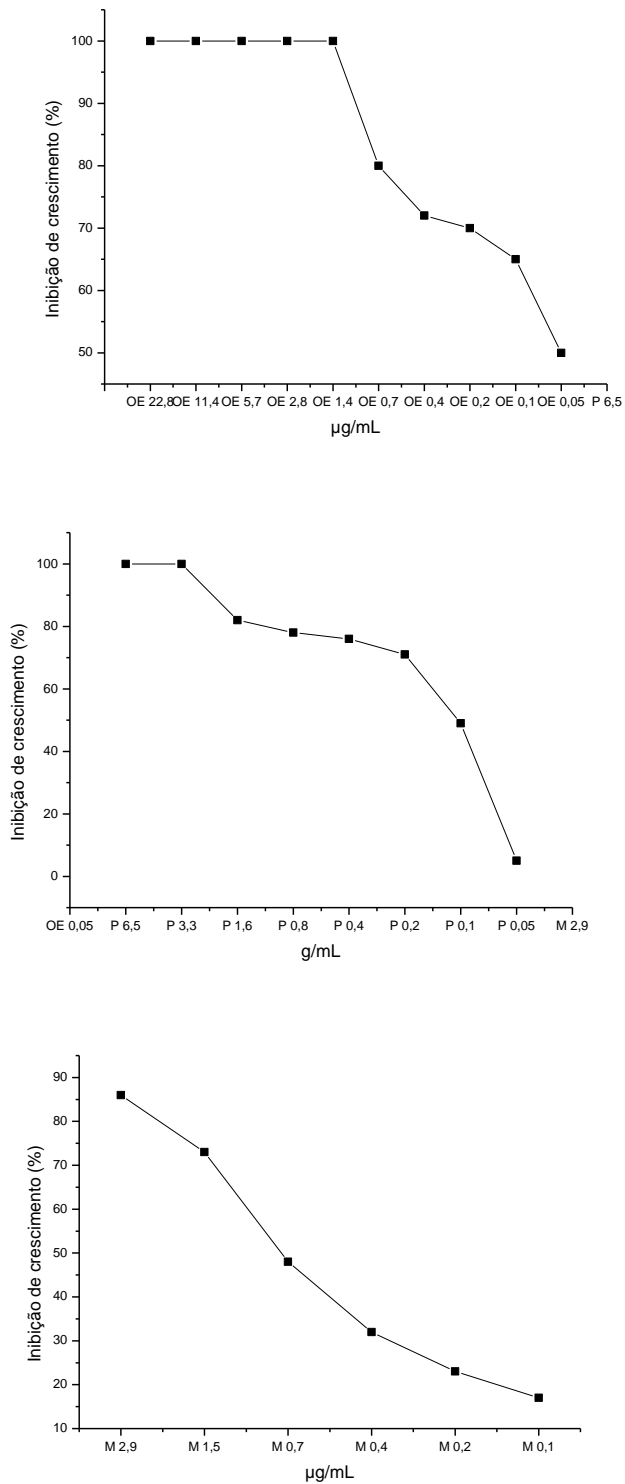


Figura 29 - Efeito dose-resposta ($\mu\text{g/mL}$ -% de inibição de crescimento microbiano) do óleo essencial de *M. setosa* (A), Pulegona (B) e mentona frente *Aspergillus niger* ATCC 16404 10^3 UFC/mL após 72 horas de incubação; OE= óleo essencial; P= pulegona; M= mentona

Em relação às análises de todos os resultados anteriormente apresentados, pode-se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) do óleo essencial de *M. setosa* da pulegona e da mentona; esses valores são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida ou Fungicida Mínima (CBM/CFM) do óleo essencial de *Minthostachys setosa*, da pulegona e da mentona

Microrganismo	Concentração do óleo essencial ($\mu\text{g/mL}$)		Concentração pulegona ($\mu\text{g/mL}$)		Concentração mentona ($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM-MFC	CIM	CBM-CFM	CIM	CBM - CFM
<i>E. coli</i>	2,8	5,7	1,6	3,3	>2,9	ND
<i>S. aureus</i>	0,4	0,7	1,6	3,3	2,9	ND
<i>P. aeruginosa</i>	0,4	0,7	0,8	1,6	>2,9	ND
<i>C. albicans</i>	0,7	1,4	0,8	1,6	>2,9	ND
<i>A. niger</i>	1,4	2,8	1,6	3,3	>2,9	ND

ND=não detectado

Verificou-se que o óleo essencial de *M. setosa* apresentou melhor atividade contra *S. aureus* (Tabela 5 e Figura 20) e *P. aeruginosa* (Tabela 5 e Figura 22). O composto majoritário pulegona apresentou o mesmo comportamento (Tabela 5 e Figuras 20 e 22), além de ser eficaz contra *C. albicans* (Tabela 5 Figura 24). Na tabela 5, os intervalos de valores da CIM do óleo essencial estão entre 0,4 e 2,8 $\mu\text{g/mL}$ e os da pulegona entre 0,8 e 1,6 $\mu\text{g/mL}$; considerando que a carga microbiana desafiada foi a mesma, 10^4 a 10^5 UFC/mL, observa-se que o composto majoritário pode ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana no ensaio realizado. Entretanto, se a proporção da pulegona contida no óleo essencial fosse de acordo com a cromatografia gasosa com espectro de massas (28,6%), Tabela 4, o intervalo dos valores do CIM a ser encontrado seria de 0,1 a 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados sugerem que outros componentes do óleo essencial, como o carvacrol 2,6% (PAVEL; RISTIĆ; STEVIĆ, 2010; GALLUCCI et al., 2009), estariam também agindo na atividade antimicrobiana. Em relação à mentona, outro composto majoritário que representa 11,6% do óleo essencial, a atividade antimicrobiana não foi eficaz em comparação com pulegona, mostrando somente atividade contra *S. aureus* (Figura 20,22 e 24).

Os resultados acima mencionados corroboram os de Oumzil et al. (2000), que estudaram a ação antimicrobiana de óleos essenciais de *Mentha suaveolens* Ehrh, a qual apresentava os mesmos componentes majoritários. Nesse estudo foi também a pulegona que apresentou a ação antimicrobiana mais potente. Em pesquisa semelhante, Imai et al. (2001) testaram essa atividade em óleos essenciais de *M. piperita*. e *Mentha arvensis* L. e verificaram ação contra as bactérias *S. aureus* e *Helicobacter pylori*. Frente a esse último microrganismo, sugere-se que a utilização, na medicina popular, de infusão de folhas frescas de *M. setosa* em distúrbio gastrointestinal (DE FEO, 1998; PRIMO, 1999) deva-se a essa atividade antimicrobiana.

Os resultados obtidos nesse trabalho vislumbram a utilização do extrato liofilizado, do óleo essencial e da pulegona como fármacos antimicrobianos e como conservantes em formulações farmacêuticas e cosméticas.

O interesse pela busca de novas substâncias ativas naturais é tendência atual, aliado ao desejo do consumidor em adquirir produtos com apelo natural. Muitos compostos aromáticos são atualmente obtidos sinteticamente, por razões econômicas ou por dificuldade na obtenção das plantas produtoras. Contudo, a busca pelos princípios ativos naturais tem feito crescer a demanda pelos produtos originais obtidos diretamente das plantas. Além do mais, há dificuldades para que os aromas sintéticos se aproximem com perfeição dos aromas naturais.

6. Conclusões

- O extrato liofilizado de partes aéreas de *M. setosa* a 0,125% (p/v) mostrou atividade antimicrobiana frente *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027 e 10^4 UFC/mL de *C. albicans* ATCC 10231.

- O óleo essencial de partes aéreas de *M. setosa* a 0,00028% (p/v) e o composto majoritário pulegona a 0,00016%(p/v) mostraram atividade antimicrobiana frente *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. albicans* ATCC 10231 e *A. niger* ATCC 16240. A mentona apresentou atividade a 0,00029% (p/v) frente *S. aureus* ATCC 6538.

- Entre os compostos majoritários, pulegona foi o principal responsável pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de partes aéreas de *M. setosa*.

Referências

ACHA, S.Z. **Posibilidades y potencialidad de la agroindustria en el Perú en base a la biodiversidad y los bionegocios**. Lima: Comité Biocomercio Perú, 2001. Disponível em: <http://infoagro.net/shared/docs/a5/dair108.pdf>. Acesso em: 08 Jun. 2009.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishy, 2007. 804p.

AKERELE, O. **Importance of medicinal plants: WHO'S Programme in Natural Resources and Human Health**. Geneva: WHO, 1992. Disponível em: <http://www.cababstractsplus.org/abstracts/Abstract.aspx?AcNo=19936716044>. Acesso em: 06 Ago. 2009.

AKERELE, O. Programa OMS de medicina tradicional: progresos y perspectivas. **Crónica de la OMS**, v.38, n.2, p.83-88, 1984.

ALIAGA, T.J.; FELDHEIM, W. Hemmung der Keimbildung bei gelagerten Kartoffeln durch das ätherische öl der südamerikanischen Muñapflanze (*Minthostachys* spp.). **Ernährung**, v.9, p.254-256, 1985.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, p.119–128, 1993.

ANNAPURNA, J.; BHALERAO, U.T.; IYENGAR, D.S. Antimicrobial activity of *Saraca asoca* leaves. **Fitoterapia**, v.70, n.1, p.80-82, 1999.

BANDONI, A.L, Aspectos básicos del diseño de un Equipo industrial para la extracción de aceites esenciales mediante arrastre con vapor. en: **Vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas e sabores**. Argentina 2002, cap.10, p.160-179.

BANDONI, A.L, Generalidades sobre los procesos extractivos utilizados en la obtención de aceites esenciales in: **Vegetales aromáticos en Latinoamérica Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas e sabores**. Argentina, 2002, cap. 09, p.136-159.

BANDONI, A.L.; MENDIONDO, M.E.; RONDINA, R.V.D.; COUSSIO, J.D. Survey of Argentine medicinal plants. Folklore and phytochemical screening II. **Economic Botany**, v.30, p.161–185, 1976.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; BIONDI, D.M.; RUBERTO, G. Chemical composition, antibacterial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, p.618–627, 1998b.

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

BARBOUR, E.; SAHRIF, M.; SAGHRAN, V.; HABRE, A.; TALHOUK, R.; TALHOUK, S. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.1-7, 2004.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. cap.111, p.1117-1125.

BOONCHILD, C.; FLEGEL, T. *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, p.1235-1241, 1982.

BRESOLIN, T.M.B. CECHINEL FILHO, V. (Orgs.). **Ciências farmacêuticas**, Itajaí: ed. Univali. p.35-37, 2003.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial proprieties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.4, p.223-225, 2004.

CAI, L.; WU, C.D. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. **Journal of Natural Products**, v.59, p.987–990, 1996.

CARSON, C.F.; COOKSON, B.D.; FARRELLY, H.D.; RILEY, T.V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.35, p.421–424, 1995.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *In vitro* activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against *Streptococcus* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.37, p.1177–1181, 1996.

CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, n.4, p.255-258, 2002.

CINIGLIO, G. **Eucalipto para a produção de óleos essenciais**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1993. 15p.

COLLINS, C.H. Antimicrobial susceptibility tests. In: COLLINS, C.H.; LYNE, P.M.; GRANGE, J.M. **Microbiological methods**. 7.ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, 1995. 493p.

CONNOR, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, v.49, p.429-434, 1984.

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

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.

CRAGG, G.M.; NEWMANN, D.J.; SNADER, K.M.; Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v.60, n.1, p.52-60, 1997.

CRESPO, M.E.; JIMENEZ, J.; GOMIS, E.; NAVARRO, J. Antibacterial activity of the essential oil of *Thymus serpylloides* subspecies *gadorensis*. **Microbios**, v.61, p.181-184, 1990.

CRUZ, T.; CABO, M.P.; CABO, M.M.; JIMENEZ, J.; CABO, J.; RUIZ, C. *In vitro* antibacterial effect of the essential oil of *Thymus longiflorus* Boiss. **Microbios**, v.60, p.59-61, 1989.

CTFA. Technical guidelines. US Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association. Inc, New York 2001

CUNHA, A.P., coord. **Farmacognosia e fitoquímica**. 2.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. p.10-11.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.105-108, 2004.

CHATTOPADHYAY, D.; MAITI, K.; KUNDU, A.P.; CHAKRABORTY, M.S.; BHADRA, R.; MANDAL, S.C.; MANDAL, A.B. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.49-55, 2001.

CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B.K.; VAID, L.K. Antibacterial activity of *Syzygium* species. **Fitoterapia**, Milão, v.69, n.4, p.365-367, 1998.

CHAUDHURI, N.A.K.; PAL, S.; GOMES, A.; BHATTACHARYA, S. Anti-inflammatory and related actions of *Syzygium cuminii* seed extract. **Phytotherapy Research**, West Sussex, v.4, n.1, p.5-10, 1990.

DE FEO, V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. **Fitoterapia**, v.63, p.417-440, 1992.

DE FEO, V.; RICIARDI, A.; BISCARDI, D.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostachys verticillata* (Griseb). Epl. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.10, p.61-65, 1998.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, p.165-180, 1987.

DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P. Antibacterial activity of French tarragon (*Artemisia dracunculus* Linn.) essential oil and its constituents during ontogeny. **Journal of Horticultural Science**, v.63, p.503–508, 1988.

DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P. Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. **Journal of Horticultural Science**, v.64, p.205–210, 1989.

DIMITRI, M.J. Descripción de las especies cultivadas en la Argentina. In: PARODI, L.R. **Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería**. Buenos Aires: Editorial ACME, 1980. 925p.

DJIPA, C.D.; DELMEE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1/2, p.307-313, 2000.

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

DUPONT, S.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B.; DYKES, GA. *In vitro* antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food Control**, v.17, n.11, p.929-932, 2006.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.

EL-SEEDI, H.R.; SATA, N.; TORSELL, K.B; NISHIYAMA, S. New labdene diterpenes from *Eupatorium glutinosum*. **Journal Natural Product**, v.65, p.728-729, 2002.

EPLING, C.C. Synopsis of the American Labiatae. **Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih.**, v.85, p.162-168, 1936.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 3.ed. Maisonneuve SA, Sainte-Ruffine, 1975, 68p.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6.ed. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007.

FALKENBERG, M.B. et al. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. (org.). **Farmacognosia- da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre/ Florianópolis : UFRGS/ UFSC, 2002. Cap.4, p.63-72.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 446-451p.

FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOERJATO, D.D.; ZHENGANG, G. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v.63, n.6, p.965-981, 1985.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LOPEZ, S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, n.1, p.103-107, 2001.

FRANQUENIONT, C.; PLOWMAN, T.; FRANQUEMONT, E.; KING, S.R.; NIEZGODA, C.; DAVIS, W.; SPERLING, C.R. **The ethnobotany of Chinchero, an Andean Community in Southern Peru**. Washington: Field Museum of Natural History, 1990. 150p. (Fieldiana Botany New Series, n.24; Publication, n.1408).

FUERTES, R.C.; MUNGUÍA, S.Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb muña de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. **Ciencia e Investigación**, v.4, n.1, p.23-39, 2001.

GALLARDO, P.P.R.; SALINAS, R.J.; VILLAR, L.M.P. The antimicrobial activity of some spices on microorganisms of great interest to health. IV. Seeds, leafs and others. **Microbiologie, Aliments, Nutrition**, v.5, p.77-82, 1987.

GALLUCCI, M.N.; OLIVA, M.; CASERO, C.; DAMBOLENA, J.; LUNA, A.; ZYGADLOB, J.; DEMOA, M. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, p.348-354, 2009.

GARG, S.C.; DENGRE, S.L. Antibacterial activity of essential oil of *Tagetes erecta* Linn. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v.28, n.1/4, p.27-29, 1986.

GHANNOUM, M.A. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). **Journal of General Microbiology**, v.134, p.2917-2924, 1988.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; WYLLIE, S.G.; WARMINGTON, J.R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, n.3, p.194-198, 1998.

HARREWIJN, P.; VAN OOSTEN, A.M.; PIRON, P.G.M. Functions of natural terpenoids in the relationships between organisms. In: _____. **Natural Terpenoids as Messengers: A Multidisciplinary Study of Their Production, Biological Function and Practical Applications**. London: Kluwer Academic Publishers, 2001, cap.5 p. 181-252.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy**. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone, 2004. 309p.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.-L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

IEVEN, M.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; TOTTE, J. Plant antiviral agents. 3. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regal (Amaryllidaceae). **Journal of Natural Products**, v.45, p.564-573, 1982.

IMAI, H.; OSAKA, K.; YASUDA, H.; HAMASHIRA, H.; ARAI, T. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint on the growth of pathogenic bacteria. **Microbios**, v.106, p.31-39, 2001.

INOUE, S.; GOI, H.; MIYOUCHI, K.; MURAKI, S.; OGIHARA, M.; IWANAMI, I. Inhibitory effect of volatile components of plants on the proliferation of bacteria. **Bokin Bobai**, v.11, p.609-615, 1983.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 533p.

JAIN, S.R.; KAR, A. The antibacterial activity of some essential oils and their combinations. **Planta Medica**, v.20, p.118-123, 1971.

JANSSEN, M.A.; SCHEFFER, J.J.C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. Antimicrobial activities of essential oils: a 1976-1986 literature review on possible applications. **Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition**, v.9, n.4, p.193-197, 1987.

JANSSEN, M.A.; SCHEFFER, J.J.C.; PARHAN-VAN ATTEN, A.W.; SVENDSEN, A.B. Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. **Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition**, v.10, p.277-280, 1988.

JAY, J.M.; RIVERS, G.M. Antimicrobial activity of some food flavouring compounds. **Journal of Food Safety**, v.6, p.129-139, 1984.

JETTY, A.; IYENGAR, D.S. Antimicrobial activity of *Millingtonia hortensis* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v.38, n.2, p.157-160, 2000.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.76, p.626-631, 1994.

KARAMAN, I.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.231-235, 2003.

KATERERE, D.R.; GRAY, A.I.; NASH, R.J.; WAIGH, R.D. Anti-microbial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae, **Phytochemistry**, v.63, p.81-88, 2003.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, v.72, n.7, p.825-828, 2001.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G.N.; MCCLOUD, T.G.; TUCKER, K.D.; SHOEMAKER, R.H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. **Journal Natural Product**, v.67, p.1732-1735, 2004.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v.1, p.119-128, 1989.

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

LAMIRI, A.; LHALOUI, S.; BENJILALI, B.; BERREDA, M. Insecticidal effects of essential oil against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). **Field Crops Research**, v.71, p.9-15, 2001.

LARRONDO, J.V.; AGUT, M.; CALVO-TORRAS, M.A. Antimicrobial activity of essences from labiatae. **Microbios**, v.82, p.171-172, 1995.

LIN, F.; HASEGAWA, M.; KODAMA, O.; Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.67, p.2154-2159, 2003.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p.759-762, 1997.

LOCHER, C.P.; BURCH, M.T.; MOWER, H.F.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Antimicrobial activity and anticomplement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, n.1, p.23-32, 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000. 991p.

MANTILLA HOLGUÍN, J. Cultivo ecológico de plantas medicinales y aromáticas: ampliando las perspectivas económicas en los Andes. **LEISA: Revista de Agroecología**, v.21, n.2, 2005. Disponível em: http://latinoamerica.leisa.info/index.php?url=show-blob-html.tpl&p%5Bo_id%5D=78034&p%5Ba_id%5D=211&p%5Ba_seq%5D=0. Acesso em: 27 Ago. 2008.

MOODY, J.O.; ADEBIYI, O.A.; ADENIYI, B.A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **Journal or Ethnopharmacology**, v.92, p.57-60, 2004.

MORA, F.D.; ARAQUE, M.; ROJAS, L.B.; RAMIREZ, R.; SILVA, B.; USUBILLAGA, A. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb Vaught from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**, v.4, n.7, p.997-1000, 2009.

MUKHERJEE, P.K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S.C.; PAL, M.; SAHA, B.P. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.60, n.1, p.85-89, 1998.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.247-256, 2000.

NENOFF, P.; HAUSTEIN, U.F.; BRANDT, W. Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. **Skin Pharmacology**, v.9, p.388–394, 1996.

NGWENDSON, J.N.; BEDIR, E.; EFANGE, S.M.; OKUNJI, C.O.; IWU, M.M.; SCHUSTER, B.G.; KHAN, I.A. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 587-589, 2003.

NUNAN, E.A.; CAMPOS, L.M.M.; PAIVA, R.L.R.; OLIVEIRA, S.T.; DADOUN, H.A.; OLIVEIRA, A.B. Estudo da atividade antimicrobiana de extrato de folha de *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc. **Revista de Farmácia e Bioquímica**, v.6, n.1, p.33-40, 1985.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v.4, n.1, p.23-31, 1995.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIERRE, G.J.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.155-162, 1997.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Spaphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-420, 2007.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V.R.; KOLE, C.R.; SAHOO, S. Antibacterial activity of essential oils from *Cymbopogon*: interand intra-specific differences. **Microbios**, v.84, p.239–245, 1995.

PAVEL, M; RISTIĆ, M; STEVIĆ, T. Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 75, p.27-34, 2010.

PÉLISSIER, Y.; MARION, C.; CASADEBAIG, J.; MILHAU, M.; KONE, D.; LOUKOU, G.; NANGA, Y.; BESSIERE, J.-M. A chemical, bacteriological, toxicological and clinical study of the essential oil of *Lippia multiflora* mold (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.6, n.6, p.623–630, 1994.

PEREZ, C.; ANESINI, C. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinian medicinal plants. **Fitoterapia**, v.65, n.2, p.169–172, 1994.

PINTO, J.A.P.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Dosagem microbiológica de antibióticos e fatores de crescimento. In: _____. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.261-290.

PRIMO, V.; ROVERA, M.; ZANON, S.; OLIVA, M.; DEMO, M.; DAGHERO, J.; SABINI, L. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.33, n.2, p.113-117, 2001.

RAJANI, M.; SAXENA, N.; RAVISHANKARA, M.N.; DESAI, N.; PADH, H. Evaluation of the antimicrobial activity of ammoniacum gum from *Dorema ammoniacum*. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.7, p.534-541, 2002.

RAMESH, N.; VISWANATHAN, M.B.; SARASWATHY, A.; BALAKRISHNA, K.; BRINDHA, P.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.1, p.129-132, 2002.

RECIO, M.C.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. **Phytotherapy Research**, v.3, p.77–80, 1989.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol**, v.100, p.80-84, 2005.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. **Journal of Ethnopharmacology**, v.21, p.139–152, 1987.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antibacterial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.23, p.127–149, 1988.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

ROMERO, E.; TATEO, F.; DEBIAGGI, M. Antiviral activity of *Rosmarinus officinalis* L. extract. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v.80, p.113-119, 1989.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.621-632, 2005.

SAHM, D.F.; WASHINGTON II, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. cap.110.

SANDRA, P. & BICCHI, C. Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. 1987. New York: Huething. pp.259-274.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p.403-434.

SCAZZOCCHIO, F.; COMETA, M.F.; TOMASSINI, L.; PALMERY, M. Antibacterial activity of *Hydrastis Canadensis* extract and its major isolated alkaloids. **Planta Medica**, v.67, p.561-564, 2001.

SCHMIDT-LEBUHN, A.N. Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.343-353, 2008.

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a Thyme (*Thymus pulegioides* L.) Growing Wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.1327-1332, 1996.

SENATORE, F. Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epl. (Lamiaceae) from Peru. *Flavour and Fragrance Journal*, v.13, p.263-265, 1998.

SHAFI, P.M.; ROSAMMA, M.K.; JAMIL, K.; REEDY, P.S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancorium* leaf essential oils. **Fitoterapia**, Milão, v.73, p.414-416, 2002.

SHAPIRO, S., MEIER, A.; GUGGENHEIM, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v.9, p.202-204, 1994.

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

SHERIF, A.; HALL, R.G.; EL-AMAMY, M. Drugs, insecticides and other agents from *Artemisia*. **Medical Hypotheses**, v.23, p.187-193, 1987.

SHRIMALI, M.; JAIN, D.C.; DAROKAR, M.P.; SHARMA, R.P. Antibacterial activity of *Ailanthus excelsa* (Roxb). **Phytotherapy Research**, v.15, p.165-166, 2001.

SHUNYING, Z.; YANG, Y.; HU Aidong, Y.; YUE, Y.; GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.151-158, 2005.

SIKKEMA, J.; DE BONT J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.8022-8028, 1994.

SIMIÉ, A.; SOKOVIC, M.; RISTIC, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v.18, p.713-717, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas medicinais populares no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

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

SOHN, H.Y.; SON, K.H.; KWON, C.S.; KWON, G.S.; KANG S.S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora avescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**, v.11, p.666-672, 2004.

SORAU, S.B.; BANDONI, A.L. Labiadas. In: _____, eds. **Plantas de la medicina popular Argentina**. Buenos Aires: Albatros, 1994. p.62-64.

SPRINGFIELD, E.P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, p.434-439, 2003.

STEINEGGER, E; HÄNSEL, R.. **Pharmakognosie**, 5th ed. Berlin: Springer Verlag. 1992.

SUFFREDINI, I.; SADER, H.; GONÇALVES, A.; REIS, A.; GALES, A.; VARELLA, A.; YOUNES, R. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.375-384, 2004.

TADEG, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.168-175, 2005.

TEIXEIRA, C.C.; FUCHS, F.D.; BLOTTA, R.M.; KNIJNIK, J.; DELGADO, I.C.; FERREIRA, E.; COSTA, A.P.; MÜSSNICH, D.G.; RANQUETAT, G.G. Effect of tea prepared from leaves of *Syzygium jambos* on glucose tolerance in non-diabetes subjects. **Diabetes Care**, Alexandria, v.13, n.8, p.907-908, 1990.

THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility testing: general considerations. In: BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. cap.107

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.52, p.399-403, 1989.

U.S. Pharmacopoeia. THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 32/ THE NATIONAL FORMULARY, NF 27 ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2009.

UEDA, S.; YAMASHITA, H.; NAKAJIMA, M.; KUWABARA, Y. Inhibition of microorganisms by spice extracts and flavouring compounds. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v.29, n.2, p.111-116, 1982.

UGARTE OCHOA, M.A.; ALENCASTRE MEDRANO, L.; SICOS HUAMÁN, A. La Muña en el conocimiento popular Andino. In: CABALLERO OSORIO, A.A.; UGARTE, M.A., eds. **Muña: investigación y proyección social**. Cuzco: Instituto de Investigaciones UNSAAC - NUFFIC, 1984. p.5-16.

ULTEE, A.; BENNINK M.H.J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F.A.; SMID, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v.174, p.233-238, 2000.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4606-4610, 1999.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.373-378, 2001.

ULLOA, C. Aromas y sabores andinos. In: MORAES R., M., ØLLGAARD, B., KVIST, L.P., BORCHSENIUS, F., BALSLEV, H., eds. **Botánica económica de los Andes Centrales**. La Paz: Asociación para la Biología de la Conservación, Universidad Mayor de San Andrés, 2006. p.313-328.

VIEIRA, P.C. Estrategias para o isolamento de princípios ativos de plantas. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 7.ed. Campinas, 2005. **Livro de Resumos e Programação**. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 2005.

VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Forestais**, n.17, p.1-30, ago. 2003.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.49-54, 2004.

WHITE, A. **Herbs of Ecuador**. Quito: Ediciones Libri Mundi, 1982. p.267.

YOU DIM, K.A.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. The antioxidant effectiveness of thyme oil, α -tocopherol and ascorbyl palmitate on evening primrose oil oxidation. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p.643–648, 1999.

ZA IKA, L.L.; KISSINGER, J.C.; WASSERMAN, A.E. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. **Journal of Food Science**, v.48, p.1455-1439, 1983.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v.39, n.3, p.221-225, 2001.