



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**FITODISPONIBILIDADE DE METAIS, CARACTERIZAÇÃO
NUTRICIONAL, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DA *Cinnamomum zeylanicum***

Breyn

VERA LÚCIA NEVES DIAS

SAPIENTIA ÆDIFICAT

**João Pessoa – PB - BRASIL
Outubro/2009**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**FITODISPONIBILIDADE DE METAIS, CARACTERIZAÇÃO
NUTRICIONAL, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DA *Cinnamomum zeylanicum***

Breyn

VERA LÚCIA NEVES DIAS*

Tese apresentada como requisito
para obtenção do título de Doutor
em Química pela Universidade
Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento

2º Orientador: Prof^o. Dr. Antônio Gouveia de Souza

***Bolsista (UEMA)**

**João Pessoa – PB - BRASIL
Outubro/2009**

D541f Dias, Vera Lúcia Neves.

Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da Cinnamomum zeylanicum Breyn / Vera Lúcia Neves Dias. - João Pessoa, 2009.

88f. : il.

Orientadores: Adenilde Nascimento Ribeiro, Antônio Gouveia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

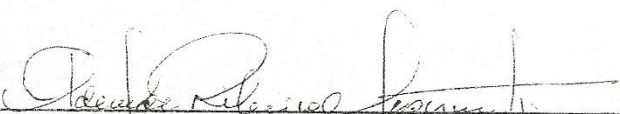
1. Química. 2. Óleo essencial. 3. Cinnamomum zeylanicum Breyn. 4. Antioxidante.

UFPB/BC

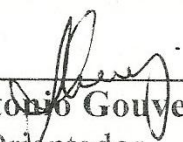
CDU: 54(043)

Fitodisponibilidade de Metais, Caracterização Nutricional, Constituição Química, Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana do Óleo Essencial Extraído das Folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

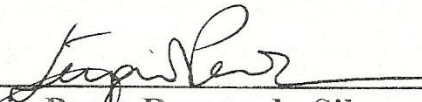
Aprovada pela banca examinadora:



Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento
Orientadora/Presidente



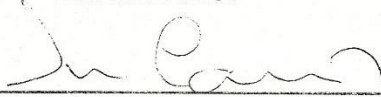
Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
2º. Orientador



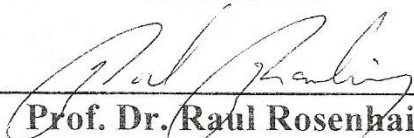
Prof. Dr. Sergio Peres Ramos da Silva
Examinador



Prof. Dr. Petronio Filgueiras de Athayde Filho
Examinador



Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho
Examinador



Prof. Dr. Raul Rosenhaim
Examinador

"A luz raia nas trevas para o integro (*salmo 112:4*)
E assim seguir o seu clarão.
As ordenanças do senhor são verdadeiras (*salmo 19*)
Esperei sua determinação.
Tudo posso; naquele que me fortalece (*filipenses 4:11-9*)
Dei meus passos, confiante.
O senhor é meu pastor (*salmo 23*)
E nada me faltou.
Não tema; eu o ajudarei (*Isaías 41-13*)
Tive a certeza da vitória.

***Obrigada meu bom Deus
Por ser a luz que me conduz."***

DEDICATÓRIAS

Ao meu primeiro instrutor dos desígnios da vida: quem hoje luta; amanhã das vitórias desfruta; só quem planta com carinho colhe do pomar divino; somente através da dedicação chegamos à superação. Obrigada pelo auxílio ontem, Hoje e sempre, pois cada passo que dou, sinto a tua presença do meu lado; acreditando e incentivando-me na busca pelos meus ideais. Essa vitória é nossa, papai! *Hilton Mascenas Dias (in memorian)*.

À flor que me gerou e ensinou-me o caminho da bondade e do amor, á minha mãe mais do que querida: *Maria das Neves Cruz Dias*.

Duas gotas de orvalho, que saciam à minha sede, reflexos de luz, incentivo que me conduz; meu filho e meu esposo: *Deivid e Agnaldo*, amores que sempre me acompanharam. Meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, por tudo.

Aos meus pais: *Hilton Mascena Dias* (in memorian) e minha mãe *Maria das Neves Cruz Dias*.

Aos amores da minha vida: *Deivid e Agnaldo*

Aos meus companheiros de difíceis lutas vencidas, meus irmãos: *Hiltomar, Dalvina, Jesusmar, Fausto, Hilton Jonas, Moisés, Severa Maria, Ana Lourdes e Ana Paula*. A vocês... Um obrigado especial pelo grande apoio fraternal.

Aos pingos de luz que ajudaram a iluminar minha vida: *Deivid Hilton, Diogo e Pamela Brito Dias*. Que a minha busca incessante por condições favoráveis a dar sempre o melhor para vocês lhes sirva de exemplo e reflexão.

Aos meus sobrinhos: *Marcelo (in memorian), Vânia, Flavio, Vinicius, Júnior, Valter, Juliana, Fabiana, Rafaela, Paula Vitória, Fausto Júnior, Yuri, Ítalo, Marna, Mármora, Alexander, Yasmim, Ellen Nikolle* e a terceira geração da família Dias: *Mikaela, Victor, Pedro Nicolas e Vinicius*, foram pensando em vocês que também encontrei forças para seguir adiante, obrigado por vocês existirem.

À família *Chaves Nunes*, mas em especial à minha segunda mãe, dona *Josuíla*, pelos ensinamentos, incentivos e todo amor que me dedicou, como se transmite a uma filha.

À minha orientadora *Prof^a. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento*. Hoje me sinto mais convicta e capaz, isso devo muito a você, pois muito apreendi com sua orientação. Portanto, a você os mais sinceros agradecimentos que um ser vivo pode transmitir ao outro, não com palavras, pois não haveria espaço para tantas, mas sim com um sentimento... O da mais intensa gratidão.

Ao *Prof^o. Dr. Antonio Gouveia Souza*. Gerar doutores não é fácil, é tarefa difícil demais. Obrigada professor, pela oportunidade singular da minha vida. O Maranhão agradece pelo auxílio na formação de novos intelectuais e eu em especial.

À *Universidade Federal da Paraíba*.

À Coordenadora de Pós-graduação em Química da UFPB, Prof^a. *Dra. Regiane de Cássia Maritan Ugulino de Araújo*, pela oportunidade concedida.

Ao *Marcos Pequeno*, secretário de Pós-Graduação em Química da UFPB, pela assistência constante durante a minha jornada.

À *Universidade Federal do Maranhão*, pelo suporte nas realizações dos trabalhos de pesquisa, sem esta ajuda nada disso seria possível desta forma, meus sinceros agradecimentos.

Ao *Departamento de Química e Biologia da Universidade Estadual do Maranhão – CESI* por me conceder meu afastamento para fazer o doutorado.

À *UEMA* pela concessão da bolsa.

Aos Professores: *Dr. João Elias Mouchrek Filho*, em especial ao *Dr. Victor Elias Mouchrek Filho* por todo apoio dado, fatores decisivos na criação do meu trabalho.

À minha querida amiga *Josilene*, todo afeto do mundo é pouco para expressar o quanto tua assistência nestes cruciais momentos foi importante nesta minha caminhada.

A todos os alunos guerreiros que fazem parte deste mestrado e doutorado da UFPB, em especial: *Alberto, Nestor, Aníger, Jethânia, Antônio, Manacés, Janyeid, Silvio, Joelkson, André, Jemmla, Vasconcelos e Luzenir*.

Ao *André Gustavo*, meu atencioso, paciente e prestativo amigo, muito obrigada pela contribuição na parte experimental deste trabalho e por fazer parte da construção da minha história.

À amiga *Jethânia*, por durante todo esse tempo de convívio mais do que ninguém demonstrou os verdadeiros significados: do respeito; da amizade; do companheirismo e acima de tudo, como superar as dificuldades com um sorriso transmitindo paz e amor. Obrigada amiga, por você existir.

Aos meus amigos de caminhada: *Rosilene, Kátia, Geraldo, Ivaneide, Jane, Elizabete*, em especial ao meu afilhado *Jordano* por entender da minha ausência e acreditar na minha jornada.

Ao meu amigo *Cássio* pela ajuda nas coletas das folhas de canela. Sua contribuição foi de fundamental importância para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

Aos professores Doutores: *Edmar e Aldaléa*, todos os momentos que estive aos seus lados tentei sugar sempre o melhor de vocês, hoje me encontro mais entusiasmada e consciente. Obrigada, por terem contribuído para o meu enriquecimento; tanto como pessoa quanto profissional.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Água do Pavilhão Tecnológico da UFMA: *Josilene, Jane, Waldênia, Marlucy e Natanael* por fazer do laboratório um ambiente saudável.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica da UFMA: *Jethânia, André, Alex, Rose, Paulina, Flávio, Glaucia, Sakae, Franscristiane, Rafael, Umarley, Luene, Conceição*, em especial *Richardson e Wendel* por compartilharem comigo os momentos mais difíceis e felizes desta jornada.

As minhas amigas da Central Analítica da UFMA, *Janyeid, Luciana, Vívía, Jemmla* em especial a *Raimudinha* pela ajuda na determinação de metais.

Aos amigos do Laboratório de Físico-Química e Água do Pavilhão Tecnológico da UFMA, *Paula, Joacy* em especial a *Natale* pela ajuda nos trabalhos de Laboratório.

À todos os amigos do Laboratório de Análise e Pesquisa em Química Analítica de Petróleo e Biocombustível: *Glene, Eva Micheli, Marcelo, Andréia*, em especial ao *Antônio Araújo* que muito me ajudou nos momentos mais difíceis da minha vida.

À *Kiany* amiga e companheira que conquistei durante a realização deste trabalho. Obrigada companheira por fazer parte desta grande luta.

À *Natale* pela ajuda nos experimentos físicos químicos que muito contribuíram para realização desta pesquisa.

Aos amigos do Pavilhão Tecnológico *Josy, Sheila, Zequinha, Dona Neves, Dona Dica e Conceição* pelo carinho, e descontração encontrada em vocês, foram importantes durante o tempo desta minha jornada.

Ao Herbário da UFMA, em especial á Prof^a. *Ana Zélia Silva* do Departamento de Farmácia, pela ajuda na Identificação da espécie vegetal estudada.

Ao meu amigo *Flávio*, por ter me atendido nos momentos mais inconvenientes, me auxiliando na parte técnica, corroborando para o êxito deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof^o. Mestre *José Franco* pelos cálculos de estatística.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

p.

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais sobre plantas medicinais.....	1
1.2 Aspectos gerais sobre a <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela).3	3
1.3 Noções sobre óleos essenciais.....	5
1.4 Fitodisponibilidade de metais em plantas.....	7
1.4.1 Metais nas plantas.....	8
1.5 Importância nutricional das plantas.....	11
1.6 A importância dos metabólitos primários nas planta.....	13
1.7 A importância dos óleos essenciais nas plantas medicinais.....	14
1.7.1 Óleo essencial da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (Canela).....	15
1.8 Atividade antioxidante.....	17
1.8.1 Avaliação in vitro de atividade antioxidante.....	19
1.9 Óleos essenciais e sua importância na atuação antimicrobiana.....	20
1.10 Patógenos Testados.....	23
1.10.1 <i>Escherichia coli</i>.....	23
1.10.2 <i>Staphylococcus aureus</i>.....	24
1.10.3 <i>Serratia odorífera</i>.....	23
1.10.4 <i>Listeria monocytogenes</i>.....	25
1.10.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	25

1.10.6 <i>Proteus mirabilis</i>	26
1.11 Resistência bacteriana a antibióticos comerciais	26
1.12 Objetivos	28
1.12.1 Geral	38
1.12.2 Específicos	28

CAPÍTULO 2

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	29
2.1 Equipamentos e Materiais	29
2.1.1 Moinho elétrico	29
2.1.2 Extrator de Clevenger	29
2.1.3 Espectrofotômetro Uv-Visível	29
2.1.4 Espectrofotômetro de Absorção Atômico	29
2.1.5 Cromatógrafo a Gás acoplada à Espectro de Massas	30
2.2 Metodologia Experimental	30
2.2.1 Amostragem	30
2.2.2 Identificação botânica	31
2.2.3 Extração do óleo essencial	31
2.2.3.1 Determinação do tempo de extração	32
2.2.3.2 Características físicas do óleo essencial da canela	32
2.2.3.3 Rendimento	33
2.2.3.4 Densidade	33
2.2.3.5 Solubilidade em etanol (70%)	33
2.2.3.6 Índice de refração	33
2.2.3.7 Cor	33
2.2.3.8 Aparência	34
2.2.4 Determinação dos metais	34
2.2.4.1 Folhas secas	34
2.2.4.2 Extrato bruto	34
2.2.4.3 Chá por infusão	34
2.2.4.4 Óleo essencial	35

2.2.5 Análises bromatológicas.....	35
2.2.6 Atividade antioxidante da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.....	36
2.2.6.1 Determinação do radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl).....	37
2.2.7 Análise do óleo essencial por CG/MS.....	37
2.2.8 Atividade antibacteriana da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.....	38
2.2.8.1 Cepas bacterianas e preparação do inóculo.....	38
2.2.8.2 Avaliação da atividade antibacteriana "in vitro" do óleo essencial extraído das folhas <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.....	39
2.2.8.2.1 Prova de sensibilidade pelo método de difusão de discos.....	39
2.2.8.2.2 Prova de sensibilidade por diluição em caldo.....	39
2.2.9 Teste de susceptibilidade dos antibióticos comerciais.....	40
2.2.10 Análises estatísticas dos tamanhos dos halos.....	40
 CAPÍTULO 3	
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1 Rendimento do extrato bruto.....	41
3.2 Cinética de extração do óleo essencial.....	41
3.3 Características físicas do óleo essencial.....	44
3.4 Resultados dos metais.....	45
3.5 Resultados das análises bromatológicas das folhas de canela.....	48
3.6 Avaliação do potencial antioxidante.....	50
3.7 Identificação e quantificação dos constituintes do Óleo Essencial das folhas da canela.....	54

3.8 Avaliação antibacteriana do óleo <i>Cinnamomum zeylanicum</i>.....	57
3.8.1 Análises da zona de inibição do óleo.....	57
3.8.1.1 Análises da variância do tamanho do halo(mm).....	58
3.9 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial da canela.....	60
3.10 Susceptibilidade dos antibióticos comerciais versus o óleo essencial da canela.....	62
CAPÍTULO 4	
4 CONCLUSÕES.....	66
4.1. Considerações para trabalhos futuros.....	67
CAPÍTULO 5	
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69
APÊNDICE.....	80

LISTA DE FIGURAS

p.

Figura 1 Caneleira.....	4
Figura 2 Caneleira plantada no sitio vila são José–Maioba, Município de paço do Lumiar–Maranhão.....	30
Figura 3 Sistema Extrator de Clevenger.....	32
Figura 4 Esquema da curva do óleo essencial de canela com o radical DPPH.....	36
Figura 5 Esquema do método CLSI.....	80
Figura 6 Método de diluição em caldo.....	81
Figura 7 Cinética referente ao rendimento de extração do óleo essencial da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn em função do tempo, com massa de 300g e temperatura de 100°C.....	43
Figura 8 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de cobre.....	82
Figura 9 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de potássio.....	82
Figura 10 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de níquel.....	83
Figura 11 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de ferro.....	83
Figura 12 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de zinco.....	84
Figura 13 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de cromo.....	84
Figura 14 Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de magnésio.....	85

- Figura 15** Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de cádmio.....85
- Figura 16** Cinéticas da reação de consumo do radical livre DPPH[•] (Absorbância 517nm em função do tempo de reação) ao agregar diferentes concentrações do extrato etanólico do óleo essencial extraído das folhas *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.....51
- Figura 17** Gráfico da concentração da concentração em mg/mL de extrato etanólico do óleo essencial das folhas de canela versus IC % no decorrer do tempo.....53
- Figura 18** Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das folhas de canela **(A)** 2-Metil-5-(Metiletenil)-Ciclohexanol, **(B)** Cinamaldeído, **(C)** Eugenol, **(D)** Trans-Cariofileno, **(E)** Alfa-Cariofileno e **(F)** Farnesol.56
- Figura 19** Representação gráfica da zona de inibição referente à atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn): **A** = *Escherichia coli* (padrão); **B** = *Escherichia coli* (alface); **C** = *Escherichia coli* (ambiente); **D** = *Staphylococcus aureus*; **E** = *Listeria monocytogenes*; **F** = *Pseudomonas aeruginosa*; **G** = *Serratia odorífera* e **H** = *Proteus mirabilis*.....57
- Figura 20** Halo de inibição do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente: **A** = *E.coli* padrão ATCC, **B** = *E. coli* isolada do ambiente, **C** = *Staphylococcus aureus* e **D** = *Serratia odorífera*.....86
- Figura 21** Concentração inibitória mínima do óleo essencial de Canela frente:**A** = *Serratia odorífera* e **B** = *Listeria monocytogenes*.....88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação dos elementos essenciais às plantas.....	p. 10
Tabela 2 Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.....	45
Tabela 3 Determinação dos metais das folhas secas (FS), extrato bruto (EB), chá de infusão (I) e óleo essencial (OE) da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn.....	47
Tabela 4 Caracterização nutricional das folhas <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela).....	48
Tabela 5 Dados de atividade antioxidante (%) do óleo de canela.....	52
Tabela 6 Compostos identificados na amostra óleo essenciais extraído das folhas da <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Breyn (Canela).....	55
Tabela 7 Análise da variância da zona de inibição do óleo essencial da canela frente às bactérias patogênicas.....	59
Tabela 8 Concentração inibitória mínima do óleo essencial de canela frente a bactérias patogênicas.....	61
Tabela 9 Efeito dos antibióticos comerciais sobre a ação mediante as cepas de bactérias patogênicas.....	63
Tabela 10 Padrão interpretativo dos antibióticos comerciais.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMDIS – Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System

AA(%) - Porcentagem de atividade antioxidante

BHI - Infusão Cérebro e Coração

CE₅₀ - Concentração eficiente a 50%

CI₅₀ - Concentração inibitória a 50%

CBM - Concentração bactericida mínima

CLO – Cloranfenicol

CEF – Cefalotina

CIM – Concentração inibitória mínima

C – Matéria orgânica associada com adubo químico

CG/EM - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DPPH - 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl

DNA - Ácido desoxirribonucléico

GEN - Gentamicina

MO – Matéria orgânica

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standart

OMS – Organização Mundial de Saúde

OE – Óleo essencial

FS – Folhas secas

EB – Extrato bruto

IC% - Concentração inibitória em percentual

I – Chá de infusão

ISO - International Standard Organisation

ND – Não detectável

PCA - Ágar Plate Count

PEN - Penicilina

PCA – Ágar Plate Count

TET- Tetraciclina

VAN - Vancomicina

RESUMO

FITODISPONIBILIDADE DE METAIS, CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, CONSTITUIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DA *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

Autora: Vera Lúcia Neves Dias

Orientadora: Prof^a.Dra. Adenilde Nascimento Ribeiro

2º Orientador: Prof^o. Dr. Antônio Gouveia de Souza

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática antiga. Estima-se que a maioria das plantas usadas na medicina popular não foi estudada a respeito de seus componentes químicos, ações farmacológicas e suas reais indicações terapêuticas, sem considerar as plantas cujas propriedades medicinais não foram identificadas. O gênero *Cinnamomum* (Lauraceae) é constituído por aproximadamente 350 espécies, muitas das quais produtoras de óleo essencial. A Canela tem várias finalidades, sendo utilizada na agricultura, para controle de nematóides, fungicida, na arborização urbana, nas indústrias de cosméticos, na culinária e na medicina popular. Este estudo teve como objetivo avaliar: a fitodisponibilidade de metais, a caracterização nutricional, a constituição química, a avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. As folhas da canela, inicialmente foram secas em temperatura ambiente, em seguida moídas para posterior extração do óleo essencial. A extração foi realizada utilizando-se o método de hidrodestilação. A determinação dos teores nutricionais da canela foi em média: 59,590% umidade, 1,320% cinzas, 3,730 % proteína, 3,030 % fibra bruta, 3,050% lipídeos, 29,100% amido e 32,310% carboidratos. Os resultados demonstram uma disponibilidade para os metais Ni e Cu, como menor e maior concentração respectivamente, 0, 0007 mg/L e 367,800. Os extratos etanólicos do óleo essencial da canela em diversas concentrações testadas apresentaram um potencial antioxidante e foi sensível frente às bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia odorífera*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*. Diante do aprofundamento deste estudo, o referido óleo pode ser apresentado como agente antimicrobiano em potencial, tornando-se uma alternativa terapêutica promissora em futuro próximo, sobretudo para a população mais carente.

Palavras-Chave: Óleo essencial, *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, Fitodisponibilidade, Antioxidante, Antimicrobiano.

ABSTRACT

PHYTOAVAILABILITY OF METALS, NUTRITIONAL CHARACTERIZATION, CHEMISTRY CONSTITUTION, EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL EXTRACTED FROM *Cinnamomum zeylanicum* Breyn's LEAVES.

Author: Vera Lúcia Neves Dias

Mastermind: Prof^a.Dra. Adenilde Nascimento Ribeiro

2nd Mastermind: Prof^o. Dr. Antônio Gouveia de Souza

The use of plants to medicine aims is an ancient practice. It's estimated that most of the plants used in the popular medicine has not been studied about their chemical compounds, phamacological action and their actual therapeutic indications, without consider the plants that has not been still identified. The *Cinnamomum* (Lauraceae) gender is constituted by approximately 350 species, many of them producers of essential oil. The Cinnamon has many aims, being used in the agriculture, to control nematodes, fungicide, in the urban forestation, cosmetics, cookery and in the medicine. This study had as aim evaluate: the phytoavailability of metals, nutritional characterization, chemistry constitution, evaluation of the antioxidant and antibacterial activity of essential oil extracted from *Cinnamomum zeylanicum* Breyn's leaves. The cinnamon's leaves initially were dried in room temperature, after, ground to next extraction of essential oil. The extraction was carried out using the hydrodistillation method. The determination of nutritional contents of the cinnamon was in average: 59.59% humidity, 1.320% ashes, 3.730% protein, 3.030% rough fibre, 3.050% lipids, 29.100% starch and 32.310% carbohydrates. The results show an availability to Ni and Cu metals, as low and high concentration respectively, 0.0007mg/L and 367.800. The ethanoic extracts of the essential oil from cinnamon in many tested concentrations presented a potential antioxidant and were sensitive front to the bacteria: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia odorífera*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. In the face of the deepening of this study, the mentioned oil can be presented as a potential antimicrobial agent, becomes a promising therapeutic alternative in a near future, especially to the poorest population.

Key-words: Essential oil, *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, Phytoavailability, Antioxidant, Antimicrobial.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.2. Considerações gerais sobre plantas medicinais

Desde a antiguidade, o homem utiliza plantas para a cura de doenças, para o controle de insetos e para a conservação de corpos, descobertas que ocorreram por acaso e que, atualmente, estão sendo comprovadas pela ciência. Em toda a parte da planta podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e que dão origem a uma série de substâncias conhecidas como alcalóides, flavonóides, cumarinas, saponinas, óleos essenciais, entre outras. Uma das classes mais importante é a dos óleos essenciais, que são compostos voláteis e, quando liberados pelas plantas, agem como sinais químicos para a comunicação entre espécies, na proteção contra microrganismos, herbívoros e condições ambientais (LIMA, 2006; FREIRE, 2008).

Segundo MORESCHI et al. (2005) nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos. Neste contexto e decorrente do uso etnomedicinal, a fitoterapia é amplamente praticada. Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população poucas têm ação comprovada. Contudo, o uso popular tradicionalmente consolidado tem sido utilizado como guia para pesquisas farmacológicas.

Conforme, MELLO et al. (2005) o uso de vegetais tem se difundido largamente nos últimos anos no tratamento de muitas doenças, na forma de medicamentos fitoterápicos. Por esta razão, existe um interesse crescente sobre o estudo da composição desses vegetais, tanto para constituintes orgânicos como para os inorgânicos (LOPES et al., 2002; GOMES et al., 2004). Além dos componentes orgânicos que apresentam outras propriedades medicinais, os macros e micronutrientes

são importantes como suplementos nutricionais. Os macronutrientes podem favorecer a ativação de complexos enzimáticos fundamentais para processos bioquímicos vitais para o organismo humano. Entretanto, a alta concentração dos mesmos pode ser prejudicial. Por outro lado, os micronutrientes são importantes, pois podem ativar enzimas, como a angiotensina que, quando ativada pelo zinco, produz hipertensão, ou a peroxidação lipídica, quando ativada pelo ferro (NAPPI; VASS, 2002).

A oxidação lipídica ocorre quando o oxigênio reage com lipídios em uma série de reações em cadeia dos radicais livres que é freqüentemente iniciada pela exposição dos lipídios à luz, calor, radiação ionizante, íons metálicos ou catálise metalo-protéica, e que conduzem a complexas alterações químicas. A oxidação de lipídios em alimentos causa perdas na qualidade e, em seres humanos, pode causar diversas doenças como câncer, arteriosclerose, e processo de envelhecimento (ATOUI et al., 2005; FUKUMOTO et al., 2000; GÓMEZ, 2003; IBAÑEZ et al., 2000).

O valor intrínseco de uma planta medicinal está no seu efeito terapêutico. Elas possuem substâncias que são ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos, sendo responsáveis pelo efeito terapêutico; a estas substâncias é dado o nome de princípio ativo (MONTANARI, 2002).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais, para o tratamento de enfermidades, está relacionada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus. Por muito tempo, tal procedimento representou a principal forma de cura, especialmente entre a população rural. Entretanto, com o processo de urbanização e o desenvolvimento da indústria química, os alopáticos sintéticos passaram a predominar na terapia moderna.

Atualmente, observa-se uma crescente redescoberta do valor das plantas medicinais em decorrência não só de certos efeitos colaterais imprevistos de muitos remédios sintéticos (alopatos), embora o uso incorreto dos remédios naturais também possam causá-los, como também

do seu elevado preço, visto que está atrelado a poderosos interesses capitalistas internacionais.

1.2 Aspectos gerais sobre a *Cinnamomum zeylanicum* (canela)

O gênero *Cinnamomum* (Lauraceae) é constituído por aproximadamente 350 espécies, muitas das quais são produtoras de óleo essencial. O valor comercial dos óleos de *Cinnamomum* depende da espécie e da parte da planta utilizada (FAO, 1995). Os óleos essenciais mais importantes no mercado mundial são os obtidos de *C. verum* ("*cinnamomum bark oil*" e "*cinnamomum leaf oil*"), *C. cassia* ("*cassia oil*") e *C. camphora* ("*sassafras oil*" e "*ho leaf oil*"). *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Cinnamomum verum* J. S. Presl.), conhecida como "canela-da-índia" e "canela-do-ceilão" é originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. A parte interna da casca do tronco e dos ramos constitui a canela do comércio, com vasto uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares além de ser, popularmente, utilizada como estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica. A canela e o seu óleo essencial são empregados como corretivos do odor e do sabor na preparação de alguns medicamentos (LIMA, 2005).

A caneleira é uma árvore originária do Ceilão, da Birmânia e da Índia e conhecida há mais de 2500 anos a.C. pelos chineses, como mostra a Figura 1. Seu nome científico, "*cinnamomum*", segundo referências, é derivado da palavra indonésia "kayu manis", que significa "madeira doce". Mais tarde, recebeu o nome hebreu "quinnamon", que evoluiu para o grego "kinnamon". A canela era a especiaria mais procurada na Europa e seu comércio era muito lucrativo. O monopólio do comércio da canela esteve nas mãos dos portugueses no século XVI, passou para os holandeses, com a Companhia das Índias Orientais,

quando esses expulsaram, em 1656, os portugueses do Ceilão. A partir de 1796, o comércio da canela passou para domínio inglês com a expulsão dos holandeses do Ceilão.



FONTE: Próprio autor, 2007

Figura 1 *Caneleira*

A caneleira requer cerca de 1.300 mm de chuva por ano e temperatura média anual superior a 21°C. A casca dos ramos é comercializada em rama (pau), raspas e pó. A caneleira é utilizada na culinária, na fabricação de bebidas, medicamentos, perfumes e sabonetes. Outras espécies do gênero *Cinnamomum* e *Cassia* também produzem canela. A canela é uma árvore de ciclo perene que atinge até 8 a 9 metros de altura. O tronco alcança cerca de 35 cm de diâmetro. As folhas são coriáceas, lanceoladas, com nervuras na base, brilhantes e lisas na parte superior e verde-clara, e finamente reticulada na parte inferior. As flores

são de coloração amarela ou esverdeada, numerosas e bem pequenas, agrupadas em cachos ramificados (BALMÉ, 1978; SCHIPER, 1999).

De acordo com a literatura, a *Cinnamomum zeylanicum* apresenta como composição química as seguintes substâncias: ácido cinâmico, açúcares, aldeído benzênico, aldeído cinâmico, aldeído cumínico, benzonato de benzil, cimeno, cineol, eugenol, felandreno, furool, linalol, metilacetona, mucilagem, oxalato de cálcio, pineno, resina, tanino e vanilina. As partes da plantas mais utilizadas são: óleo essencial e casca desidratada. A *Cinnamomum zeylanicum* apresenta como propriedades medicinais: adstringente, afrodisíaca, anti-séptica, aperiente, carminativa, digestiva, estimulante, hipertensora, sedativa, tônica e vasodilatadora (BALMÉ, 1978; SCHIPER, 1999).

Praticamente se utiliza a parte aérea do vegetal como um todo. As folhas são utilizadas para a extração de óleos essenciais, mas a parte mais valorizada é realmente a casca dos ramos. No comércio encontra-se a canela em pó, rasurada e em cascas enroladas em si mesmas e medindo cerca de 20 a 25 cm de comprimento (MORSBACH, 1997).

1.3 Noções sobre óleos essenciais

É importante salientar que a Organização internacional de padronização (ISO) define óleos essenciais como sendo os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos polícarpos de frutos cítricos (*Rutaceae*). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Eles são assim chamados por serem: geralmente de aparência oleosa e serem líquidos; voláteis; geralmente possuem aroma agradável; solúveis em

solventes apolares, como o éter. Em água, eles apresentam solubilidade limitada, mas o suficiente para aromatizar suas soluções aquosas, que nesse caso são denominadas hidrolatos (DI STASI, 1996; LEMOS, 1990).

Segundo MONTEIRO (2008), a constituição química dos óleos essenciais é muito complexa, chegando alguns a centenas de compostos com funções orgânicas diferentes: hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e fenóis.

Os óleos essenciais apresentam as mais diversas ações farmacológicas, conforme algumas genéricas a seguir:

- ação eupépticas (digestiva): condimentos como orégano, manjeriço, sálvia, tomilho etc.

- hiperemizante local: óleo de menta, que é rico em mentol; a cânfora como princípio ativo isolado.

- antisséptica: óleo essencial de cravo, devido ao eugenol; óleo essencial de eucalipto, devido à grande quantidade de cineol (OMS, 2002).

Óleos essenciais são líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, de fácil volatilidade e aroma agradável, e normalmente são também chamados de essências. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, sendo raros os óleos essenciais azuis e, normalmente, apresentam o sabor geralmente acre (ácido) e picante. Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos principalmente de compostos terpênicos. Os óleos essenciais podem estar armazenados em certos órgãos vegetais, nas flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos ramos (canela), madeiras (sândalo, pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz moscada) (SIMÕES et al., 2003).

Conforme OLIVEIRA (2007), os óleos essenciais são produtos obtidos por arraste à vapor de água ou pela água quente e são constituídos por substâncias voláteis. As suas composições estão

fortemente dependentes das matérias-primas obtidas e dos processos de extração. Em pequena escala, emprega-se o processo denominado hidrodestilação (SIMÕES et al., 2003).

É interessante notar que os óleos essenciais diferem-se quimicamente dos óleos fixos e dos minerais. Os primeiros são misturas de terpenos e oxigenados, juntos com outros tipos de compostos orgânicos. Já os óleos fixos são ésteres da glicerina com ácidos graxos de longas cadeias. Enquanto que os últimos óleos citados são parafinas líquidas misturados a outros hidrocarbonetos de peso molecular elevado (WILLIANS, 1996).

Entre os óleos essenciais comercializados no mundo, os provenientes de especiarias representam um nicho de mercado crescente. Dentre esses óleos, merecem destaque aqueles ricos em eugenol, pois apresentam um elevado valor de mercado.

1.4 Fitodisponibilidade de metais em plantas

O aumento da população e a expansão industrial têm conduzido a um acúmulo de resíduos, cuja disposição final no ambiente é o mais grave problema. A disposição inadequada desses resíduos pode comprometer a qualidade ambiental, contaminando e poluindo o ar, a água e o solo. Durante muito tempo o descarte no ambiente foi indiscriminado, provocando danos, muitas vezes, irreversíveis ou de difícil recuperação. Só nas últimas décadas a preocupação com as questões ambientais acentuou-se, principalmente quanto à contaminação e poluição do solo e da água (GONÇALVES, 2008).

De acordo com ALMEIDA et al. (2002), sabe-se que um grande número de elementos minerais é essencial para a nutrição humana e de outros mamíferos, desempenhando funções específicas no organismo. Pode-se mencionar como exemplo, o cálcio e o magnésio, que atuam na

formação de ossos, dentes e tecidos. O potássio, quando associado ao sódio, regulariza o funcionamento do sistema muscular e os batimentos cardíacos. Alguns dos elementos minerais são encontrados em quantidades relativamente baixas no corpo humano e são chamados de oligoelementos, como é o caso do zinco, ferro, cobalto, manganês, níquel e flúor. O zinco e o manganês servem como ativadores essenciais em uma série de reações metabólicas catalisadas por enzimas, sendo, portanto, elementos muito importantes para a reprodução e o crescimento. O ferro é um componente das moléculas de hemoglobina, mioglobina, citocromo e de alguns sistemas enzimáticos, desempenhando um papel essencial no transporte de oxigênio e respiração celular. O alumínio também é um oligoelemento, porém, não essencial para os seres vivos, sendo que a intoxicação por este metal parece estar relacionada com uma variedade de distúrbios neurológicos e comportamentais (MAGALHÃES, 2000; MASSEY et al.,1991), como por exemplo, o mal de Alzheimer, demência pré-senil, esclerose amiotrófica lateral e mal de Parkinson (MASSEY et al.,1991). Em grandes quantidades, o alumínio pode interferir na absorção de fosfato, levando ao raquitismo. A maior parte do alumínio absorvido pelo ser humano é oriunda dos alimentos e da água.

1.4.1 Metais nas plantas

Segundo MENGEL & KIRKBY (2001), sob o ponto de vista fisiológico é difícil justificar a classificação dos elementos essenciais às plantas segundo a classificação de macro e micronutrientes, dependente da concentração do nutriente nos tecidos da planta. Segundo estes autores, a classificação dos elementos essenciais às plantas seguindo um critério que leve em consideração os processos bioquímicos e as funções fisiológicas é mais apropriada, e estabeleceram uma classificação dos nutrientes em quatro grupos segundo algumas características (Tabela 1).

Plantas são capazes de absorver e de acumular diversos elementos que estão presentes no solo. Os metais micronutrientes (cobre, zinco, manganês, ferro e níquel) são requeridos em pequenas quantidades, podendo ser tóxicos em altas concentrações. Os elementos cádmio, chumbo e mercúrio são considerados não essenciais ou sem função no desenvolvimento dos vegetais. Plantas podem absorver esses elementos em níveis baixos, a partir do solo, e estocar grandes quantidades deles em seus tecidos, resultando em bioacumulação destes e entrada na cadeia alimentar (EPSTEIN e BLOOM, 2006).

Segundo ALLOWAY (1995), os fatores que afetam a absorção dos metais pelas plantas são: a concentração e especiação do metal na solução do solo, o movimento do metal no solo e na superfície da raiz, o transporte do metal da superfície da raiz para dentro da raiz e a translocação da raiz para parte aérea.

Tabela 1 Classificação dos elementos essenciais às plantas

Nutrientes	Absorção	Funções Bioquímica
<p>1º Grupo</p> <p>C. H. O. N. S</p>	<p>Na forma de CO_2, $\text{HCO}_3\text{-H}_2\text{O}$, O_2, NO_3^-, NH_4^+, N_2, SO_4^{2-}, SO_2, na forma de íons da solução do solo, de gases e da atmosfera.</p>	<p>Maior constituinte de compostos orgânicos. Elementos essenciais de grupos atômicos que são envolvidos em processos enzimáticos. Assimilação por reações de oxidação-redução.</p>
<p>2º Grupo</p> <p>P, B</p>	<p>Na forma fosfatos, ácido bórico ou borato, absorvidos da solução do solo.</p>	<p>Esterificação com grupos alcoólicos em plantas. Os esteres de fosfato estão envolvidos em reações com transferência de energia.</p>
<p>3º Grupo</p> <p>K, Mg, Ca, Mn, Cl</p>	<p>Na forma de íons da solução do solo.</p>	<p>Funções não específicas, estabelecendo potencial osmótico. Reações mais específicas nas quais o íon proporciona um melhor arranjo em enzimas proteicas (ativação de enzima). Balanceamento iônico. Controlando a permeabilidade de membrana e o potencial elétrico.</p>
<p>4º Grupo</p> <p>Fe. Cu. Zn. Mo</p>	<p>Na forma de íons ou quelatos da solução do solo.</p>	<p>Presente predominantemente em formas quelatadas incorporadas em grupos prostéticos. Habilita o transporte de elétron através da mudança de valência.</p>

Uma absorção excessiva de elementos pode causar alterações e colapsos nos processos metabólicos, que se denomina como fitotoxicidade (KABATA-PENDIAS, 2000). Os sintomas de fitotoxicidade podem variar de acordo com a espécie, podendo ser visuais, como a presença de manchas e necroses, além do atrofiamento das raízes. Mas, segundo PIRES (2003), existem metais que sofrem pouco risco de entrar na cadeia alimentar, pois, uma vez que ocorre o aumento na absorção provoca a morte da planta. Este mecanismo vai depender da espécie.

Porém, existem plantas que são tolerantes para determinados metais e não desenvolvem sintomas. Segundo ACCIOLY e SIQUEIRA (2002), plantas tolerantes são aquelas capazes de conviver com excesso de contaminantes acumulados em seus tecidos, e esta tolerância envolve inúmeros mecanismos.

A absorção do metal pesado pela raiz pode ser tanto passiva como ativa. Absorção passiva é a difusão do íon na solução até a entrada na raiz. Absorção ativa requer energia metabólica e vai contra um gradiente químico (KABATA-PENDIAS, 2000).

1.5 Importância nutricional das plantas

Segundo RAMOS (2006), durante o processo produtivo, é preciso acompanhar o estado nutricional das plantas por meio das análises de solo e foliar. Assim, é possível obter ciclos de nutrientes equilibrados e identificar os pontos críticos para fazer correções. A melhoria e a manutenção da fertilidade do solo são fundamentais para a preservação da qualidade ambiental e da diversidade do meio ambiente. Plantas bem nutrida tornam-se mais resistentes ao ataque de patógenos, requerem menos tratamentos fitossanitários e permitem o controle do uso de agrotóxicos.

Para tanto, se faz necessário o diagnóstico do estado nutricional da planta. É fundamental interpretar os resultados da análise foliar, que consiste na comparação dos valores da concentração dos nutrientes na amostra-problema com os valores padrões publicados nas tabelas ou verificados em plantas normais, decidindo se há ou não deficiência do elemento analisado (FONTES, 2001). A diagnose nutricional, pela análise foliar, permite que se determine o status nutricional da planta com indicativos de deficiência para adequar a adubação no momento oportuno.

Mediante o diagnóstico do estado nutricional das plantas constitui-se uma ferramenta que conjuga as análises de solo e de tecido vegetal (geralmente folha), permitindo, de maneira eficaz, a identificação de desequilíbrios nutricionais e dos nutrientes mais limitantes à produção agrícola, servindo, ainda, de base para a recomendação de adubação. Essa técnica assume primordial importância na cultura perene, de ciclo muito longo, que necessita de um correto programa de adubação em todas as fases de seu desenvolvimento.

O estudo das correlações entre os caracteres físico-químicos de determinada planta com as variáveis meteorológicas é de importância, pois pode fornecer subsídios para a definição de um sistema de produção compatível com as diversas regiões agroclimáticas.

Portanto, os teores de nutrientes nas folhas nem sempre apresentam correlação direta com os teores disponíveis no solo, uma vez que outros fatores como umidade, aeração, compactação, acidez e doenças de raízes, também afetam a absorção de nutrientes pelas plantas (OLIVEIRA, 2006). É essencial salientar que o conhecimento do estado nutricional de um determinado vegetal é um requisito básico para a nutrição mineral adequada, indispensável para o alcance de alta produtividade.

Mediante o exposto à caracterização química das folhas está relacionada com o uso dos teores de nutrientes neste tecido vegetal para

diagnosticar o estado nutricional das plantas. Entre os vários fatores que podem afetar estes teores, estão os procedimentos metodológicos de análise química (BATAGLIA e SANTOS, 2001).

1.6 A importância dos metabólitos primários nas plantas

O metabolismo vegetal gera produtos denominados metabólitos primários e secundários. Os metabólitos que são primários, proteínas, lipídeos, glicídios e nucleotídeos possuem funções vitais ao organismo; os secundários são derivados do metabolismo primário e têm ação biológica que garante vantagens adaptativas e estão restritos a determinados grupos vegetais (TAIZ e ZEIGER, 2004; CARDOSO et al., 2001). As substâncias medicinais extraídas das plantas são normalmente metabólitos secundários (SANTOS, 2004).

As plantas são produtoras de substâncias químicas que podem ter alguma atividade em outros organismos vivos. Baseado nessas atividades é que se procuram os efeitos terapêuticos para o tratamento de doenças tanto em animais como em humanos (COSTA, 2004). Os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo praticamente em todos os organismos. Nas plantas superiores tais compostos se concentram freqüentemente em sementes e órgãos de armazenamento de energia e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, já que possuem papel importante no metabolismo celular básico. Eles são usados principalmente como matéria prima industrial, alimento ou aditivo alimentar e inclui produtos tais como, óleos vegetais, ácidos graxos (usados para fazer sabões e detergentes) e carboidratos (amido, pectina e celulose). Normalmente, os metabólitos primários são pouco valorizados no mercado, mas existem exceções como o beta-caroteno, que é um produto caro em função da dificuldade de extração, isolamento e purificação (COSTA, 2004).

1.7 A importância dos óleos essenciais nas plantas medicinais

O valor condimentar de uma planta está quase sempre associado ao teor de óleos essenciais, que são compostos químicos gerados durante o desenvolvimento da planta (SOUZA, et al., 2004).

SOARES et. al. (2008), discutem que o crescente interesse pelos antioxidantes naturais de extratos de plantas é devido à sua baixa toxicidade em relação aos antioxidantes sintéticos. Extratos de frutas, vegetais, cereais e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, em ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides e em compostos fenólicos e têm demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos.

ANGELO e seus colaboradores em 2008 avaliaram os efeitos, isolado e sinergista, dos antioxidantes, extrato de coentro e palmitato de ascorbila, em óleo de girassol submetido ao teste acelerado em estufa. Desta forma, o óleo de girassol isolado e adicionado de 1.600mg/kg de extrato de coentro, 500mg/kg de palmitato de ascorbila e da mistura destes antioxidantes foi submetido ao teste acelerado em estufa a 60 °C por 10 dias, cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo de 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância e aos testes de Tukey para as médias a 5%, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado. A partir dos resultados, verificou-se que os antioxidantes extratos de coentro, palmitato de ascorbila e a mistura dos antioxidantes quando adicionados no óleo de girassol apresentaram capacidade em retardar a formação de peróxidos. A mistura dos antioxidantes adicionada ao óleo de girassol apresentou um poder antioxidante maior que os antioxidantes aplicados isolados, comprovando o efeito sinérgico dos antioxidantes estudados.

1.7.1 Óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* (Canela)

Trabalhos prévios sobre o óleo de *Cinnamomum zeylanicum* indicaram uma grande diversidade da composição química, com relato de pelo menos quatro quimiotipos: eugenol (THOMAS et al., 1987; SENANAYAKE, 1978), (E)-cinamaldeído (VARIVAR e BANDYOPADHYAY, 1989; SENANAYAKE, 1978; BERNARD et al. (1989); MÖLLENBECK et al., 1997), benzoato de metila (RAO et al., 1988), linalol (JIROVETZ et al., 2001) e cânfora (SENANAYAKE, 1978).

Em contraste com outros alilbenzenos, o eugenol é reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) como seguro quando usado em alimentos em concentrações de até 1.500µg/mL. Em alimentos, o eugenol vem sendo usado basicamente como flavorizante, mas, tem também aplicações como repelente de insetos e em preparações farmacêuticas (PEREIRA e MAIA, 2007).

BENARROZ et. al.(2008), avaliou o efeito do tratamento *in vivo* com um extrato aquoso de canela na marcação de constituintes sangüíneos com ^{99m}Tc e na morfologia de hemácias de ratos Wistar. Os resultados sugerem que o extrato aquoso de canela não afetaria *in vivo* as estruturas da membrana envolvidas no transporte de íons ou o estado de oxidação dos íons estano e pertecnetato.

PATEL et al. (2007) caracterizaram o óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum verum* (Canela) usando a técnica de cromatografia gasosa com detector de massa e encontraram um teor de eugenol de 86% em sua composição.

LIMA et.al. (2005), pesquisaram os óleos essenciais das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* coletada no município de Manaus, estado do Amazonas, obtidos por hidrodestilação e analisados através de CG-EM. Vinte e três constituintes foram identificados nas folhas, dos quais o eugenol foi o que apresentou maior porcentagem (60%). Nos galhos foram identificados trinta e seis componentes, com

predominância dos monoterpenos α - e β -pineno (9,9%; 3,5%), α -felandreno (9,2%), p-cimeno (6,2%), limoneno (7,9%), linalol (10,6%); os sesquiterpenos α -copaeno (3,3%), (β)-cariofileno (6,7%), óxido de cariofileno (3,1%) e os alilbenzenos (E)-cinamaldeído (7,8%) e acetato de (E)-cinamila (9,7%).

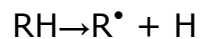
MORSBACH et al.(1997), trabalhou com óleos essenciais de cascas e folhas de canela do Ceilão (*Cinnamomum verum* Presl, sin. *Cinnamomum zeylanicum* Bl.) cultivada na Estação Experimental de Morretes do IAPAR, foram analisados por CGAR e CGAR-EM. As cascas e folhas foram provenientes de 12 árvores submetidas à adubação apenas com matéria orgânica (MO) ou associada com adubo químico (C). Análises do "headspace" foram utilizadas na caracterização das amostras individuais e no agrupamento para fins de extração por arraste a vapor e coobação. O rendimento médio de óleo essencial foi de 0,2% nas cascas e 2,0% nas folhas. O teor de aldeído cinâmico nos óleos essenciais das cascas foi de 54,7% (MO) e 58,4% (C). Os óleos essenciais de folhas apresentaram 94,1% (5 árvores - MO) e 95,1% (5 árvores - C) de eugenol. Entretanto, a composição dos óleos essenciais das folhas de duas árvores distintas, uma de cada tipo de tratamento, foi diferente da maioria das árvores estudadas, apresentando 58,7% (MO) e 55,1% (C) de eugenol, com teor elevado de safrol (29,6% e 39,5%, respectivamente). Não foram observadas diferenças na composição ou nos teores dos componentes em função do tipo de adubação.

1.8 Atividade antioxidante

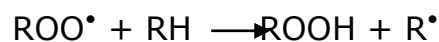
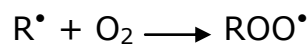
Segundo PEREZ (2004), a peroxidação lipídica in vivo é uma das possíveis causas do envelhecimento celular e da geração de células cancerosas. Essa fornece radical livres que se propagam, causando danos em moléculas lipídicas.

Esse processo pode ser ilustrado por três estágios:

Iniciação:



Propagação:

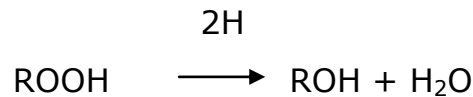


Terminação:

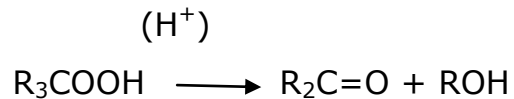


Nesse exemplo, RH representa o lipídio (geralmente um ácido graxo poliinsaturado) e R^\bullet um radical livre em carbono. O precursor molecular do processo de inicialização é geralmente um produto de hidroperoxidação (ROOH). Para controlar e reduzir a peroxidação lipídica, a natureza faz uso dos antioxidantes. Esses são divididos em duas classes: antioxidantes preventivos e inibidores da propagação em cadeia. Os antioxidantes preventivos reduzem a taxa de inicialização da reação em cadeia enquanto que os antioxidantes inibidores de propagação interferem na propagação por capturar os radicais ROO^\bullet e/ou R^\bullet . Os mecanismos são explicados a seguir:

1. Antioxidantes preventivos (ou decompositores de peróxido): reduzem estequiometricamente os hidroperóxidos a seus álcoois correspondentes

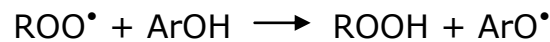


ou decompõem cataliticamente o hidroperóxido em produtos não radicalares



Exemplo disso são as enzimas, como a catalase e peroxidase, que atuam destruindo hidroperóxidos sem gerar radicais livres.

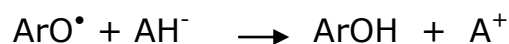
2. Antioxidantes inibidores da propagação em cadeia: são geralmente fenóis ou aminas aromáticas. A habilidade dessa classe consiste em capturar radicais peroxila. Para um fenol, por exemplo, um tocoferol, o passo inicial envolve uma transferência rápida do hidrogênio da hidroxila fenólica



O radical fenoxila é estabilizado por ressonância e é relativamente inativo frente ao RH e O₂, não dando continuidade à cadeia. Pode ser eventualmente destruído por reação com um segundo radical peróxido



ou, em alguns sistemas, o radical fenoxila pode ser reduzido a fenol pela reação com agentes redutores hidrossolúveis como a vitamina C:



Os antioxidantes principais em organismos vivos são a enzima superóxido dismutase, atuando em fase aquosa, e a vitamina E, que atua

em fase lipídica. A vitamina E é considerado (principalmente δ -tocoferol) como o maior e provavelmente um dos únicos "capturadores" de radicais peroxila - antioxidante inibidor da propagação em cadeia - solúvel em lipídios, presente no sangue humano. O anel heterocíclico na molécula de δ -tocoferol representa um importante papel na otimização da atividade antioxidante.

Muitos métodos baseiam-se na "captura" de radicais livres diferentes; entretanto, a absorção de raios ultravioleta e a capacidade de quelação colaboram na atividade antioxidante. Vários testes utilizam substâncias diferentes, como o radical superóxido ($\cdot\text{O}_2$), hidróxido ($\cdot\text{OH}$), óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), radicais alquilperóxidos, $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (cátion radicalar do 2,2-azinobis-3-etilbenzotiozolina-6-sulfonada) e o DPPH (radical a,a-difenil-b-picril hidrazina) (MOURE et al., 2001).

O radical a, a-difenil-b-picril hidrazina ou 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH) é um radical livre "estável", que detém um máximo de absorção na região do visível em 517 nm. Facilmente é reduzido em presença de substâncias antioxidantes. Estudos de relação estrutura-atividade apresentam que ácidos fenólicos dispõem de melhor atividade antioxidante que os análogos do ácido benzóico pela presença de duplas conjugadas, o que facilita a deslocalização dos radicais livres resultantes do antioxidante (RAMALHO e JORGE, 2005). Ensaio com 1,1-difenil-2-picril hidrazina (DPPH) são considerados eficientes na pesquisa de atividade antioxidante relacionada à captura de radicais livres, sendo mencionado como um agente de baixo custo, de fácil manuseio, fornecendo um teste rápido e reprodutível (RAMALHO e JORGE, 2005).

1.8.1 Avaliação *in vitro* de atividade antioxidante

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2- difenil-

1-picril-hidrazila - DPPH[•], de coloração púrpura que absorve a 515nm. Por ação de um antioxidante (AA) ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH[•] remanescente no meio reacional (SOUSA et al.,2007).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al.,2007).

1.9 Óleos essenciais e sua importância na atuação antimicrobiana

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento da saúde humana, principalmente das nações em desenvolvimento, servindo à conhecida "medicina caseira", que faz parte da cultura popular desses países, como fonte de matéria – prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos ou extração de compostos químicos, fármacos logicamente ativos. A fitoterapia existe principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população, em decorrência da comercialização de drogas vegetais sem nenhum controle quer seja fitosanitário quer seja de identidade e/ou pureza. Há a necessidade de maior e melhor controle nesse ramo

farmacêutico, pois os fitoterápicos representam uma alternativa viável à população (CORDEIRO et al., 2006).

Atualmente, em decorrência do problema de resistência microbiana, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de produtos naturais, tem aumentado o interesse das companhias farmacêuticas, especialmente, em espécies de plantas que são utilizadas na medicina popular no combate de diversas doenças, tais como resfriados, bronquites, doenças no trato respiratório, gastroenterites, diarreias, infecções urinárias, entre outras (SERRA, 2008).

Diversos vegetais têm sido utilizados com fins profiláticos e curativos de infecções, entre eles encontra-se aquele que é objeto deste estudo. Atualmente muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana.

Segundo PEREIRA et al.(2004) as propriedades antimicrobianas dos condimentos e de seus óleos essenciais têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de microrganismos patogênicos presentes em alimentos.

Em vários estudos, tem sido evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração de óleo essencial. Os óleos essenciais das espécies de condimentos contêm diferentes compostos, que contribuem com as propriedades antimicrobianas (PEREIRA et al.(2004).

De acordo com a literatura pesquisa, existem muitos trabalhos com óleo essencial da canela extraídos da casca e pouca pesquisa envolvendo o óleo extraído das folhas.

No trabalho realizado por BULLERMAN et al. (1977) sobre óleos essenciais de canela a 200 mg/mL e de cravo a 250 mg/mL constataram que estes foram inibidores do desenvolvimento e da produção de micotoxina de *Aspergillus parasiticus*, ao passo que o aldeído cinâmico (cascas) e o eugenol (folhas), principais constituintes desses óleos essenciais, apresentaram efeito inibidor a 150 e 125 mg/mL, respectivamente.

CONNER et al. (1984a,b) em estudos envolvendo 32 óleos essenciais extraídos de condimentos, demonstraram que os óleos de pimenta-da-jamaica, canela, cravo, cebola, alho, orégano, segurelha e tomilho foram, em ordem decrescente, os maiores inibidores de oito gêneros de levedura.

SOUZA, et al. (2004), realizaram o trabalho com o objetivo de avaliar o efeito "in vitro" de óleos essenciais dos condimentos alho (*Allium sativum* L.), canela (*Cinnamomum burnannil* Meissn), cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), que foram adicionados aos meios de cultura (BDA e CYA20S). Os óleos foram extraídos pela técnica de arraste a vapor e testados nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000 µg/mL, exceto o cravo, que foi testado nas concentrações de 200; 400; 600 e 800 µg/mL. Como culturas-teste, foram utilizados os fungos *Rhizopus sp.*; *Penicillium spp.*; *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, isolados de pães envelhecidos. O óleo essencial da canela inibiu completamente o desenvolvimento dos fungos testados. Os óleos de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas. O cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* e *Eurotium repens* com a concentração de 600 µg/mL e do fungo *Penicillium spp.* com a de 800 µg/mL.

SANTURIO et al. (2007), avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) frente a 60 amostras de *Salmonella enterica* distribuídas entre 20 sorovares, todos isolados de carcaças de aves. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas para cada isolado, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. O óleo essencial de orégano evidenciou forte atividade antibacteriana (CIM média = 529µg/mL e CBM média= 661µg/mL), seguido do tomilho (CIM média=961µg/mL e CBM média= 1074µg/mL), com atividade moderada,

enquanto que a menor atividade foi observada com o óleo essencial de canela (CIM média= 1335µg/mL e CBM média = 1979µg/mL).

SOARES et. al. (2005), avaliou in vitro a toxicidade de óleos essenciais vegetais contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*, isolados a partir da cultura do amendoim. Inicialmente, foi avaliada a toxicidade de oito óleos essenciais vegetais no desenvolvimento micelial de dois isolados do grupo *Aspergillus flavus*, em comparação ao fungicida sintético benomyl. Em seguida, foi avaliada a toxicidade dos óleos de casca de canela (*Cinnamomum zeilanicum Breyn*) e de bulbilho de alho (*Allium sativum* L.) contra 37 isolados do grupo *Aspergillus flavus*, durante 12 meses. A maior inibição do desenvolvimento micelial de *Aspergillus flavus* foi obtida com o emprego dos óleos essenciais de casca de canela e de bulbilho de alho, e o efeito inibitório variou com o isolado testado.

1.10 Patógenos testados

1.10.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia. coli*, é uma bactéria gram positiva pertencente à família Enterobacteriaceae, ela foi isolada pela primeira vez, em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich, sendo considerada um habitante normal do trato intestinal (NASCIMENTO, 2004).

Além de ser um habitante natural do intestino de animais incluindo o homem, exerce um efeito benéfico sobre o organismo de seus hospedeiros, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e auxiliando na síntese de vitaminas. Entretanto, existem cepas de E. coli capazes de provocar doenças em seres humanos, as quais são conhecidas como enteropatogênicas (SERRA,2008).

1.10.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae, juntamente com os gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Atualmente, o gênero possui 32 espécies (SILVA; GANDRA, 2004) e *S. aureus* é a mais relacionada a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produzir enterotoxina (JAY, 2005; SANTOS et al, 2007).

De acordo com SERRA (2008), o *S. aureus* é um microrganismo que constitui a microbiota natural das vias nasais, garganta e pele de seres humanos e animais. Em razão disso, o *S. aureus* é uma bactéria mesófila, entretanto, apresenta uma ampla faixa de temperatura de crescimento que varia de 7° a 48,5°C. O limite de pH para o seu desenvolvimento está entre 4,2 a 9,3 e são resistentes até 20% de cloreto de sódio.

1.10.3 *Serratia odorífera*

A *Serratia* é reconhecida como um patógeno importante, com propriedades invasivas e alta resistência a muitos antibióticos utilizados na atualidade. Em determinada ocasião, essa bactéria foi utilizada como comensal inócuo para detectar contaminação, a princípio, devido à característica pigmentação vermelha de algumas cepas de fácil detecção em meios de cultura (KONEMAN, 2001).

Serratia odorífera produz odor acre, similar ao de batatas com casca, daí o nome. Podem estar presentes em amostras de urina, causando infecção urinária, e são isoladas predominantemente do escarro (MENEZES, 2004).

1.10.4 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva, com motilidade, que é um freqüente patógeno veterinário, causando aborto e meningoencefalite em vacas e ovelhas, porém, há relatos em várias espécies animais. A infecção no homem não é comum, mas ocorre mais freqüentemente no período neonatal, durante a gravidez, nos idosos ou pacientes imunodeprimidos (SCHWAB, 2003). A transmissão de *Listeria monocytogenes* através dos alimentos pode causar doença em surtos ou casos isolados (SCHWAB, 2003).

Em geral, a listeriose causa sintomas típicos de gripe. Em recém-natos e idosos, pode desenvolver meningite, septicemia e óbito. Isto fez com que as indústrias alimentícias, as autoridades de Saúde Pública e pesquisadores em vários países redobrassem a atenção quanto à presença da *Listeria monocytogenes* nos alimentos (ABRAHÃO, 2005).

1.10.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo não fermentador pertencente à família *Pseudomonadaceae*. É uma bactéria que sobrevive sob condições nutricionais mínimas e tolera grandes variações de temperatura, sendo encontrada com freqüência em ambientes naturais (solo, plantas, frutas e vegetais) e hospitalares (água, desinfetantes, equipamentos e utensílios). Faz parte da microbiota do intestino e da pele humana, porém, comporta-se como patógeno oportunista em indivíduos imunocomprometidos (SOUZA, 2007).

A bactéria *P. aeruginosa* é um dos principais microrganismos recuperados de efluentes hospitalares. Está amplamente distribuída no ambiente e é capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos e desenvolver resistência a agentes antimicrobianos (FUENTEFRÍA, 2008).

1.10.6 *Proteus mirabilis*

MATOS (1989) descreve que as bactérias do gênero *Proteus* são pertencentes à mesma família do gênero *Enterobacter*, são gram negativas, facultativamente aeróbicos e quimiorgonotróficas e possuem metabolismo tanto do tipo respiratório como fermentativo.

Os *Proteus* são por excelência, agentes de putrefação e encontram-se tanto em fezes e águas de esgotos, como em carnes putrefeitas e feridas supuradas. Além do intestino de seres humanos e em uma larga variedade de animais. Várias espécies do gênero são encontradas nas fezes normais ou diarréicas. Em diarréias crônicas, qualquer que seja a espécie, esses microrganismos são freqüentemente isolados, predominando, no Brasil, as espécies *P. vulgaris* e *P. mirabilis* (OLIVEIRA, 2007).

1.11 Resistência bacteriana a antibióticos comerciais

Conforme SILVEIRA et al., 2006, no decorrer das últimas décadas, o desenvolvimento de fármacos eficientes no combate à infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, ocasionando a redução drástica da mortalidade causada por doenças microbianas. Por outro lado, a disseminação do uso de antibióticos lamentavelmente fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência. O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública. Esta resistência prolifera-se rapidamente através de transferência genética, atingindo algumas das principais bactérias gram-positivas, como *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*.

Os antibióticos, nas últimas décadas têm sido os principais agentes antimicrobianos selecionados para o tratamento de doenças infecciosas. A utilização deste termo teve início no século XX com a descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, por Alexandre Fleming (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

A essência da ação antimicrobiana do antibiótico é a toxicidade sobre o agente invasor, apresentando um efeito bacteriostático ou bactericida sobre o microrganismo sem afetar o hospedeiro (ALTHERTHUM et al, 2004).

Em relação ao mecanismo de ação do antibiótico, este pode ocorrer em diferentes pontos da célula bacteriana, tais como a inibição da síntese da parede celular, lesão da membrana citoplasmática, inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos (SERRA, 2008).

Portanto a presente tese propõe-se a contribuir para a elucidação dos estudos, discutindo a fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) através de pesquisa bibliográfica, experimental e empírica.

1.12 Objetivos

1.12.1 Geral

Estudar a parte as folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn visando determinar o teor de metais, caracterizar físico-quimicamente, avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

1.12.2 Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Caracterizar físico-quimicamente a espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn;
- Determinar o teor de metais nas folhas da espécie vegetal, por espectrometria de absorção atômica;
- Extrair quantitativamente o óleo essencial do *Cinnamomum zeylanicum* Breyn;
- Caracterizar fisicamente o óleo essencial;
- Identificar analiticamente os componentes no óleo, usando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial comparando com os dos antibióticos frente às bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia odorífera*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO 2

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Equipamentos e Materiais

2.1.1 Moinho elétrico

Para a trituração das folhas secas da canela utilizou-se o moinho elétrico Tecnal de facas, modelo TE-340.

2.1.2 Extrator de Clevenger

Um extrator de Clevenger de vidro, acoplado a um balão de fundo redondo de 6000 mL, para extração do óleo essencial foi utilizado juntamente com uma manta de aquecimento como fonte de calor.

2.1.3 Espectrofotômetro UV-Visível

Um espectrofotômetro UV-VIS marca Varian, modelo Cary 50, foi usado na determinações da atividade antioxidante com comprimento de onda de 517nm.

2.1.4 Espectrofotômetro de Absorção Atômico

As concentrações dos metais foram determinadas pelo Espectrofotômetro de Absorção Atômica modelo AA 50 com forno de grafite, e espectrofotômetro de chama modelo GTA 110 - VARIAN, acoplado a um computador DELL GX110.

2.1.5 Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas

As análises foram realizadas em equipamento CG/EM modelo QP-5000, fabricado pela Shimadzu.

2.2 Metodologia Experimental

2.2.1 Amostragem

As amostras de folhas verdes em estudo foram coletados nos meses maio a agosto do ano de 2007 (escolha aleatória) no sítio localizado na Maioba, Município de Paço do Lumiar – Maranhão. A Figura 2 mostra uma caneleira plantada no sítio. Após a coleta, o material foi transportado até o Laboratório de Físico-Química de Alimentos do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (LFQPT-UFMA) para a realização das análises pertinentes.



FONTE: Próprio autor, 2007

Figura 2 Caneleira plantada no sitio vila São José–Maioba, Município de Paço do Lumiar–Maranhão.

2.2.2 Identificação botânica

Para preparo das exsicatas, as folhas coletadas foram tratadas, prensadas e secas individualmente e acondicionadas em folhas de jornal. A temperatura aplicada para secagem foi de, aproximadamente, 38°C, por um período de 48 horas. Em seguida, as exsicatas foram enviadas ao herbário da UFMA, que efetuou a caracterização botânica da espécie com base nas características físicas do material coletado. De acordo com a caracterização botânica, a espécie de canela estudada, foi identificada pela Prof^a. especialista Ana Zélia Silva, do Departamento de Farmácia da UFMA, como pertencente à família Lauráceas, cujo nome científico é *Cinnamomum zeylamicum* Breyn, conforme características das folhas e galhos da espécie. A exsicata encontra-se depositada no herbário da UFMA sob o nº 1153.

2.2.3 Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, em um sistema de Clevenger, mantendo-se à temperatura de 100°C. Para a extração, utilizou-se 300 gramas das folhas secas e moídas com 3000mL de água destilada (proporção 1:10) como mostra a Figura 3. Posteriormente, os óleos foram secos por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro. Em seguida, esses óleos foram armazenados em frasco apropriado para posteriores análises.

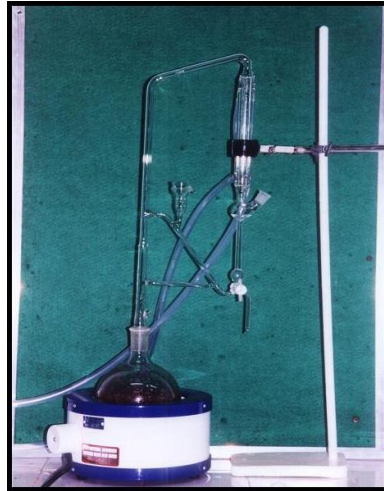


Figura 3 Sistema Extrator de Clevenger

2.2.3.1 Determinação do tempo de extração

O melhor tempo de extração foi determinado em função do rendimento do óleo essencial. Cinco extrações foram realizadas nos tempos 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 horas. Exceto o tempo, todos os outros parâmetros foram mantidos como descritos anteriormente.

2.2.3.2 Características físicas do óleo essencial da canela

Na caracterização das propriedades físicas do óleo essencial extraído das folhas da canela foram realizadas as análises de rendimento, densidade, índice de refração, solubilidade em etanol a 70% v/v, cor e aparência.

2.2.3.3 Rendimento

O rendimento foi calculado na relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

2.2.3.4 Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um balão picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras do óleo essencial.

2.2.3.5 Solubilidade em etanol (70%)

Para a determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de álcool/água a 70% (v/v), mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólica até a sua completa solubilização.

2.2.3.6 Índice de refração

Para a determinação do índice de refração, foram utilizados tubos capilares de vidro para adicionar as amostras dos óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, a uma temperatura de 25°C.

2.2.3.7 Cor

A técnica proposta é a visual, feita por comparação das cores das essências com as cores conhecidas.

2.2.3.8 Aparência

A técnica proposta também é a visual, onde se faz uma comparação das essências no que diz respeito à sua transparência ou limpidez.

2.2.4 Determinação dos metais

Com intenção de obter melhores resultados na determinação dos metais se fez necessário preparar quatro tipos de amostragem, tais como: pó das folhas secas, extrato bruto, chá por infusão e óleo essencial das folhas de canela.

2.2.4.1 Folhas secas

As folhas verdes da canela foram secas e moídas em moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340. Em seguida, o pó foi acondicionado em um recipiente apropriado.

2.2.4.2 Extrato bruto

Pesou-se 200g do pó das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* (canela), transferiu-se para um recipiente apropriado onde se acrescentou álcool etílico até a completa submersão do material (anotou-se o volume usado). O recipiente foi vedado com folha de alumínio. Deixou-se em maceração por, no mínimo, 3 dias. Ao final do prazo, o material foi filtrado, primeiramente, sobre gaze e depois sobre papel filtro. Concentrou-se o filtrado em evaporador rotativo para, depois, transferir para um frasco devidamente tarado, que foi levado à estufa para completa secagem do extrato. Depois de seco, o extrato teve sua massa medida para posterior cálculo do rendimento (MATOS, 1988).

2.2.4.3 Chá por infusão

A obtenção do chá por infusão da canela foi feita através da fervura de 100mL de água destilada e, posteriormente adicionada 1g de folha seca e moída. Deixou-se esfriar à temperatura ambiente e filtrou-se.

2.2.4.4 Óleo essencial

O óleo essencial das folhas da canela foi extraído de acordo com o item 2.2.3.

Para a determinação dos metais ferro, cádmio, zinco, cobre, potássio, níquel, cromo e magnésio foram utilizado à digestão via seca em cadinhos de porcelana, utilizando adaptação de JONES JUNIOR & CASE (1990) e PERKIN-ELMER (1973).

Inicialmente, pesou-se 1,0 g de cada material citado em 2.2.4 e, levou-se diretamente em cadinhos de porcelana. Os cadinhos foram levados ao forno-mufla ainda frio, sendo a temperatura gradativamente elevada a 500°C, na qual permaneceram aproximadamente 3 horas. Após esfriamento natural, foram adicionadas 5 gotas de HCl a 3Molar a cada cadinho, para auxiliar na decomposição. Em seguida, os cadinhos retornaram ao forno-mufla por mais 3 horas, para assegurar a completa decomposição do material. Após novo esfriamento, foram adicionados 10 mL de HCl a 3Molar e aquecimento em placa aquecedora a 80°C por 15 minutos, para a completa solubilização das cinzas. Posteriormente, foi feita a filtragem da solução com papel filtro (JP 42 Quanty Cinza 0, 007 15 cm) em balões volumétricos de 100 mL, completando o volume com água deionizada, estando assim, apta à leitura (CARNEIRO, et al. 2006). Os experimentos foram realizados num Espectrofotômetro de Absorção Atômica, modelo AA 50 com forno de grafite e chama modelo GTA 110 – VARIAN, acoplado a um computador DELL GX110.

2.2.5 Análises bromatológicas

Os experimentos foram realizados com relação à base "in natura", para melhor discussão dos resultados. Todas as análises foram realizadas com número de sete replicatas de acordo com as normas DOQ-CGGCREE-008-Revisão 01-Março/2003.

Determinaram-se os teores de umidade, cinzas, lipídeos, proteínas, amido, carboidratos, valor calórico e umidade seguindo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005), enquanto que o teor de fibra foi determinado segundo as Normas Gerais de Amostragem para Análise de Rotina (BRASIL, 1991).

2.2.6 Atividade antioxidante da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

A atividade antioxidante do óleo em estudo foi avaliada pelo método DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl). Segundo MENSOR et al. (2001) o uso do DPPH promove um caminho fácil e rápido para avaliar antioxidantes como possíveis seqüestradores de radicais livres. DPPH é um radical livre que produz uma solução violeta em etanol. É reduzido na presença de uma molécula antioxidante, dando origem às soluções etanólicas descoloridas como mostra a Figura 4.



Figura 4 Esquema da curva do óleo essencial de canela com o radical DPPH.

2.2.6.1 Determinação do radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

De acordo com MENSOR et al. (2001), foi preparada uma solução de DPPH 0,3mM em etanol, no qual foi misturado a solução da amostra em análise. Soluções-estoque foram preparadas a partir de 200 μ L do óleo essencial de canela em 10 mL de etanol. Em seguida, foram feitas diluições das soluções dos extratos etanólicos com os seguintes volumes de 0,5, 1,0, 2,0, 6,0, 13,0, 16,0 e 19,0 μ L. Em todos os respectivos volumes da amostra foi adicionado 2,5 mL da solução de DPPH e completado em etanol até o volume final de 50mL. Após 20 minutos de reação, as absorvâncias das soluções foram medidas em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda 517nm. A referência foi constituída por uma solução contendo 2,5 mL da solução de DPPH acrescido de etanol até um volume final de 50mL.

2.2.7 Análise do óleo essencial por CG/EM

A identificação da composição química do óleo essencial extraído das folhas de canela foi feita através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As análises foram realizadas em equipamento CG/EM modelo QP-5000, fabricado pela Shimadzu, usando-se uma coluna capilar (30m x 0,25mm x 0,25 μ m, HP-5MS), tendo como fase estacionária 5% difenil, 95% dimetil polisiloxano. Utilizou-se hélio como gás de arraste a um fluxo de 1,0 mL/min. Alíquotas de 0,3 μ L das amostras foram injetadas no modo split, com razão de divisão 1:10, com fonte de ionização a 70 eV. As condições de operação do equipamento foram às seguintes: temperatura do injetor: 280 $^{\circ}$ C, programação de temperatura do forno: 40 $^{\circ}$ C (5,0 min.) – 240 $^{\circ}$ C (4 $^{\circ}$ C/min.) – 240 $^{\circ}$ C – 300 $^{\circ}$ C (80 $^{\circ}$ C/min., 7,5 min.) e linha de transferência 280 $^{\circ}$ C. O detector de massas do tipo quadrupolo linear e a varredura de 0,5 seg/scan.

Para a identificação dos compostos detectados na amostra utilizou-se as bases de dados de espectros de massas NIST105, NIST21 EWILEY139. O programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System) foi utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado no banco de dados. É fundamental salientar que o espectro de cada constituinte da amostra foi comparado com cada um dos espectros armazenados no banco de dados do computador. Após esta comparação, o programa faz uma lista tríplice de compostos com sua respectiva probabilidade de ser ou não um determinado composto. Se $p > 70\%$, existe uma grande probabilidade de ser este o composto identificado. O banco de dados é limitado e, em alguns casos, indica quais seriam os prováveis constituintes, por aproximação.

2.2.8 Atividade antibacteriana da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

2.2.8.1 Cepas bacterianas e preparação do inóculo

As cepas testes utilizadas neste estudo foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia odorífera*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, as quais foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão coordenado pela Prof^a Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento. Todas as cepas foram mantidas em Ágar Triptona de Soja sob uma temperatura de 20°C.

A cultura bacteriana foi reativada inoculando-se alçadas em tubos contendo caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), por 24 horas, a 37°C. Para a determinação da menor concentração inibitória procedeu-se a padronização do inóculo com a escala 0,5 de Mac Farland.

2.2.8.2 Avaliação da atividade antibacteriana “*in vitro*” do óleo essencial extraído das folhas *Cinnamomum zeylanicum* Breyn

A susceptibilidade do óleo essencial foi avaliada utilizando-se dois métodos distintos: método de difusão de disco (CLSI, 2009) e método de diluição (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2002).

2.2.8.2.1 Prova de sensibilidade pelo método de difusão de discos

Os inóculos (0,1mL) de cada bactéria teste foram semeados sobre a superfície do meio Ágar Müeller-Hinton com auxílio de um cotonete estéril. Em seguida, sobre este, foram aderidos pequenos discos de papel de filtro impregnados com 75 µL do óleo essencial, com o auxílio de uma pinça previamente flambada. Os discos foram pressionados levemente contra a superfície do meio. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e, posteriormente, foram realizadas as leituras (ver apêndice, Figura 5, página 80).

2.2.8.2.2 Prova de sensibilidade por diluição em caldo

Em um tubo estéril foi preparada uma solução, a partir da diluição de 0,8mL do óleo essencial e 0,08mL do Tween 80 (agente emulsificante) em um volume de 9,12 mL de caldo BHI, obtendo-se uma solução a 8% em óleo. Em seguida, a partir dessa solução, foi preparada uma série de diluições, variando de 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2 a 4 % do óleo, além da solução controle contendo somente o agente emulsificante e o caldo BHI. Posteriormente, foi adicionado o inóculo bacteriano previamente preparado conforme descrito no item 2.2.8.1 em tubos de caldo BHI acrescidos de diferentes concentrações do óleo, com posterior

incubação a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento em contagem de placa de agar (PCA) como mostra a Figura 6.

2.2.9 Teste de susceptibilidade dos antibióticos comerciais

Os antibióticos comerciais utilizados como controle positivo foram: tetraciclina-TET (30µg), cloranfenico-CLO (30µg), penicilina-PEN (10µg), cefalotina-CEF (30µg), vancomicina-VAN (30µg) e gentamicina-GEN (30µg).

A sensibilidade dos antibióticos comerciais selecionados foi realizada pelo método de difusão de discos, conforme descrito anteriormente no item 2.2.8.2.1.

2.2.10 Análises estatísticas dos tamanhos dos halos

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico através da análise de variância, utilizando-se o programa ASSISTAT Versão 7.5 (<http://www.assistat.com>). Os dados foram expressos como médias comparadas pelo Teste t ao nível de 5% de probabilidade (SILVA,2009).

CAPÍTULO III

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento do extrato bruto

A obtenção do extrato de *Cinnamomum zeylanicum* deu-se pelo processo de maceração de 200 gramas de pó em etanol, adquirido através da trituração em moinho elétrico Tecnal, modelo TE-340, das folhas da planta secas, à temperatura ambiente.

Após este processo, obteve-se 34,98 gramas do extrato hidroalcoólico bruto de *Cinnamomum zeylanicum*, com rendimento de aproximadamente 17,5 %.

3.2 Cinética de extração do óleo essencial

A Figura 7 representa a relação entre o rendimento percentual do óleo extraído e o tempo de extração, para uma mesma quantidade de massa (300g) das folhas secas em pó nas condições do item 2.2.3. Observa-se ainda que o rendimento máximo do óleo extraído foi obtido após a coleta em quatro horas de hidrodestilação. Durante a cinética de extração observou-se nitidamente que houve perda no rendimento, pois o óleo extraído das folhas da canela se mostrou denso e com muita facilidade de formar hidrolato, ou seja, mistura de água com óleo.

O rendimento do óleo extraído foi calculado para a relação massa do óleo, medida por sua densidade a partir do volume de óleo obtido no sistema de extração, dividido pela massa seca da amostra. O rendimento de óleo obtido de cada amostra foi então calculado pela fórmula:

$$\text{volume óleo} \times \text{densidade}$$

$$R\% = \frac{\quad}{\text{massa}} \times 100$$

onde:

R% = rendimento em porcentagem;

volume óleo = volume de óleo em ml;

densidade = massa de um ml de óleo em g;

massa = massa seca de folhas em g.

Foi observado, que à medida que o volume de óleo aumentava na superfície do aparelho de Clevenger, pequenas gotículas retornavam ao balão de destilação e, quando o volume de óleo na superfície do aparelho aumentava consideravelmente, havia o retorno dele em forma de gotas para o balão de destilação. Isto foi devido à densidade do óleo essencial ser muito próximo à da água e, também, o vencimento da tensão superficial do aparelho de Clevenger, resultando, assim, um menor rendimento na extração do óleo essencial. Para evitar a perda de rendimento, foi necessário retirar o óleo toda vez que atingisse volume predefinido e, assim, foi possível obter um maior rendimento na extração do óleo, o que também foi observado por LULLEZ (1991) (GIRARD, 2005).

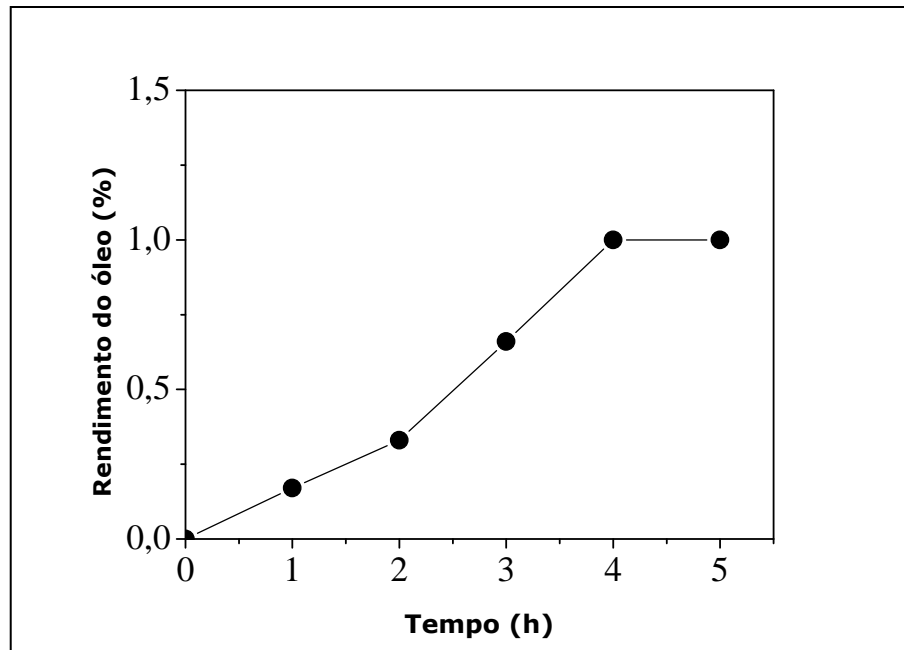


Figura 7 Cinética referente ao rendimento de extração do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn em função do tempo, com massa de 300g e temperatura de 100°C.

O valor encontrado do rendimento do óleo extraído foi de 1,1% (v/m), atribuindo-se a este valor 100%. Foi observado que grande parte do óleo essencial é extraída no início da destilação, mantendo os níveis de rendimento satisfatório na primeira hora de extração, diminuindo-se consideravelmente até a última fração (4 horas de hidrodestilação). O rendimento determinado está dentro da faixa de valores encontrados na literatura. O valor encontrado foi confirmado segundo os autores (GUENTHER, 1950; PURSEGLOVE et al.,1981) de 0,2 a 2,0% nas cascas e de 0,7 a 1,2% (GUENTHER, 1950; PURSEGLOVE et al.,1981; VERNON et al., 1976) nas folhas (KOKETSU,1997).

3.3 Características físicas do óleo essencial

Em geral, os óleos essenciais na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo inúmeras reações de degradação, o que dificulta a sua conservação, fazendo com que o seu processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (SIMÕES et al., 2004).

De acordo com SIMÕES e SPITZER (1999), pesquisadores comentam ainda que, os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta, podem apresentar composição, caracteres e odores distintos (VITTI et al., 2003). Portanto, a qualidade do óleo essencial é considerada um fator básico a ser vinculado à sua obtenção, fazendo com que a realização de amostras constantes seja de grande importância para a avaliação de suas características e, desse modo, serem prevenidos problemas na sua comercialização e uso (VITTI et al., 2003).

A Tabela 2 mostra as características físicas do óleo essencial extraído das folhas da canela no período de maio a agosto de 2007. Observa-se que o óleo apresentou uma densidade bem próxima à densidade da água, no qual vem sustentar a dificuldade encontrada durante o processo de extração pelo sistema Clevenger, (SIMÕES et al., 2004). Quanto às demais características, não foram encontradas, dadas na literatura da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. Segundo (MARINI et al., 2005), esses valores podem sofrer variações atribuídas à diferença de época de colheita, tipo de solo, clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar, no dia da colheita.

Tabela 2 Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Características físicas	Óleo essencial
Densidade (g mL ⁻¹)	1,048
Índice de refração (N _D 25 ⁰)	1,533
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:1
Rendimento (%)	1,1
Cor	Amarelo
Aparência	Límpido

De acordo com os valores obtidos das constantes físicas (Tabela 2) do óleo essencial da canela, apresentaram valores semelhantes aos valores obtidos pela literatura (KOKETSU, 1997).

3.4 Resultados dos metais

Todas as análises foram realizadas em triplicata e apresentaram desvios padrões relativos em torno de 1%. Os teores dos elementos minerais encontrados nas amostras analisadas foram calculados a partir da construção de curvas analíticas para cada elemento com um total de, no mínimo, 5 pontos e apresentando um coeficiente de regressão linear superior ou igual a 0,998 (ver apêndice, Figuras 8 a 15, páginas 82 a 85).

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para as determinações quantitativas dos metais ferro, cádmio, zinco, cobre, potássio, níquel, cromo e magnésio nas amostras calcinadas e chá, respectivamente. Para melhor compreensão dos resultados foi aplicado análise estatística, o teste t de Student para comparar se dois valores de

média são estatisticamente homogêneos, ou seja, não apresentam uma diferença significativa entre si, considerando um intervalo de confiança de 95% para análises.

Nesta Tabela, pode-se observar que na amostra OE não foi possível determinar os teores de Zn e Cd. O metal que apresentou maior teor foi com Cu $245,300 \pm 0,002$ mg/L, enquanto que o menor foi o metal Ni com $0,002 \pm 0,010$ mg/L. Nas folhas secas o Cu com $346,900 \pm 0,005$ mg/L apresentou maior teor, já o metal Cd, apresentou o menor teor com $0,012 \pm 0,030$ mg/L.

As análises feitas com o extrato bruto da canela mostraram uma maior disponibilidade para os metais em estudo, destacando-se os metais Ni e Cu, como menor e maior concentração respectivamente, $0,0007 \pm 0,0060$ mg/L e $367,800 \pm 0,003$ mg/L. É interessante comentar que na amostra de chá por infusão não encontrou-se os metais Fe e Ni. Em contra partida, o Cu continua se destacando como o metal de maior teor $318,6 \pm 0,011$ mg/L por conseqüente o Cd com o menor teor $0,003 \pm 0,004$ mg/L.

Em todas as amostras analisadas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, o metal cobre se apresentou com teor mais elevado.

Sabe-se que dependendo do tipo da planta esses metais podem variar, pois vários são os fatores que podem influenciar tais como, solo, tipo de cultivo, regiões e etc. Segundo MALAVOLTA (1989), o autor destaca uma tabela de concentrações dos elementos essenciais na matéria seca. O mesmo chama atenção para o fato de que muitas variações existem, dependendo da planta e do órgão analisado.

ABREU et al., 2002, discutiram que a previsão da quantidade de metal disponível às plantas é uma tarefa complicada que depende das características do solo, do metal, dos outros elementos presentes, da planta e do processo de determinação do metal, entre outros.

Tabela 3 Determinação dos metais das folhas secas (FS), extrato bruto (EB), chá de infusão (I) e óleo essencial (OE) da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Amostras	METAIS (mg/L)									
	Fe	Cd	Zn	Cu	K	Ni	Cr	Mg		
OE	0,320 ±0,005	ND	ND	245,300 ±0,002	1,140 ±0,003	0,002 ±0,010	0,170 ±0,004	4,000 ±0,007		
FS	22,0000 ±0,0008	0,012 ±0,030	0,39 ±0,01	346,900 ±0,005	361,00 ±0,05	0,055 ±0,010	0,452 ±0,002	21,400 ±0,032		
EB	0,700 ±0,002	0,002 ±0,004	0,147 ±0,007	367,800 ±0,003	11,000 ±0,012	0,0007 ±0,0060	0,580 ±0,003	0,11 ±0,03		
I	ND	0,003 ±0,004	0,044 ±0,010	318,600 ±0,011	12,000 ±0,007	ND	0,690 ±0,003	0,03 ±0,01		

ND = não detectável

Alguns metais, tais como cádmio e zinco no óleo essencial, ferro e níquel, na amostra de chá de infusão, não foram possíveis ser detectados. Acredita-se que talvez a metodologia utilizada para a solubilização da amostra não tenha sido suficientemente eficaz.

3.5 Resultados das análises bromatológicas das folhas de canela

Os resultados referentes às análises bromatológicas realizadas nas folhas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) para a caracterização da composição nutricional estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 Caracterização nutricional das folhas *Cinnamomum zeylanicum* (canela).

Análises (100g de amostra)	Valor Médio (%)	CV (%)
Umidade	59,590 ± 2,700	4,52
Cinzas	1,320 ± 0,030	0,31
Proteínas	3,730 ± 0,003	0,10
Lipídeos	3,050 ± 0,003	0,13
Fibra	3,030 ± 0,005	0,09
Amido	29,100 ± 0,009	0,03
Carboidratos	32,310 ± 0,007	0,02
Valor calórico (Kcal)	171,610 ± 0,114	0,07

De acordo com a Tabela 4, observa-se que o valor de umidade "in natura" encontrado foi de $59,590 \pm 2,700\%$, esse valor de água "in natura", é de fundamental importância para a manifestação de todos os fenômenos físicos, químicos e biológicos essenciais para o desenvolvimento da planta. Através deste teor que se pode avaliar o meio de difusão de solutos nas células, a alta capacidade calorífica, assim como, o teor de água, funciona como regulador da temperatura, sustentação dos tecidos vegetais, fato esse que se atribui a sua incompressibilidade. É importante salientar que o conteúdo de água nas diferentes partes do vegetal pode variar diferentemente (DIAS et al., 2008b).

Quanto ao teor obtido na determinação de cinzas, o valor obtido foi de $1,320 \pm 0,030\%$, o qual indica que as folhas de canela apresentaram mesmo em pequena porção, um resíduo mineral inorgânico que pode contribuir para determinação de sais minerais, ou seja, através deste teor pode-se ter uma posição da fitodisponibilidade de metais nesta planta.

A Tabela 4 destaca ainda o teor de carboidratos $32,310 \pm 0,007\%$, enquanto os valores encontrados de lipídeos e proteína, respectivamente, foram de $3,050 \pm 0,003\%$ e $3,730 \pm 0,003\%$. Por outro lado, os teores de fibra e de amido apresentaram os seguintes valores, respectivamente, $3,030 \pm 0,005\%$ e $29,100 \pm 0,009\%$. É sábio, discutir que a caracterização nutricional de uma planta é uma indicação muito valiosa do valor nutritivo que a mesma possa representar, porém as determinações químicas não são normalmente suficientes para a sua caracterização. Uma avaliação completa inclui a biodisponibilidade dos nutrientes, a capacidade do organismo de utilizar estes nutrientes e o estado de interação dos nutrientes com outras substâncias da planta. O equilíbrio de seus constituintes, o estado fisiológico do indivíduo, as condições de processamento e armazenamento também influem na

qualidade nutricional da planta. A análise destes fatores é requisito fundamental para o conhecimento de como um alimento pode contribuir para a saúde do indivíduo que o consome.

3.6 Avaliação do potencial antioxidante

O comportamento cinético da reação do DPPH com cada extrato etanólico do óleo essencial das folhas de canela, nas respectivas concentrações de 200 µg/mL, é mostrado na Figura 16, através na curva de dose-resposta relativa ao decréscimo da porcentagem de DPPH (% DPPH) em função do tempo (min). Observou-se que todas as concentrações do extrato do óleo apresentaram uma cinética rápida, atingindo praticamente o máximo de consumo do DPPH, com uma porcentagem de DPPH decrescente menor que 50%.

O percentual de inibição da amostra testada sobre os radicais DPPH foi calculado, convertendo em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a seguinte fórmula:

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

Onde: $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da solução etanólica de DPPH e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional, DPPH + amostra (SOUZA, et al 2007).

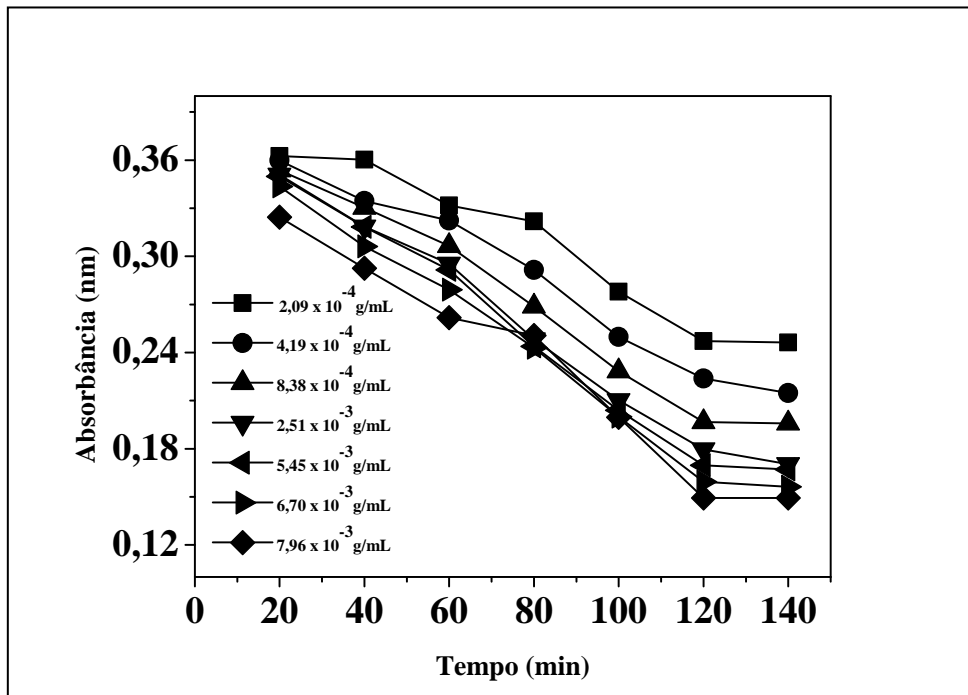


Figura 16 Cinéticas da reação de consumo do radical livre DPPH[•] (Absorbância 517nm em função do tempo de reação) ao agregar diferentes concentrações do extrato etanólico do óleo essencial extraído das folhas *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

A concentração inibitória em percentual (IC %) dos extratos foi determinada perante a média da triplicata dos valores obtidos da absorbância (Tabela 5) (PEREZ, 2004).

Tabela 5 Dados de Atividade Antioxidante (%) do óleo de canela

Concentração do extrato* [g/mL]	Atividade Antioxidante (%) (absorbância do controle em 517 nm: 0,4232)						
	← 20	40	60	t _{mim} 80	100	120 → 140	
2,09 x 10 ⁻⁴	32,80	33,50	34,90	35,50	35,80	37,33	
4,19 x 10 ⁻⁴	33,36	39,46	40,45	43,21	43,28	46,14	
8,38 x 10 ⁻⁴	40,09	42,34	46,07	48,72	49,62	52,52	
2,51 x 10 ⁻³	42,43	49,62	54,96	59,85	60,89	61,08	
5,45 x 10 ⁻³	52,83	59,49	64,55	68,80	70,29	71,24	
6,70 x 10 ⁻³	60,08	65,61	72,04	76,06	80,86	81,00	
7,96 x 10 ⁻³	60,30	67,74	72,23	78,26	79,04	81,59	
IC₅₀ (%) [g/mL]	4.55x 10⁻³	3.17x 10⁻³	2.34x 10⁻³	1.72x 10⁻³	1.55x 10⁻³	1.20x 10⁻³	5.70 x 10⁻⁴

De acordo com os dados de IC %, foi traçado um gráfico relacionando a concentração do extrato etanólico do óleo essencial de canela versus a IC % (ver Figura 17). A absorvância (A) é um valor derivado de uma função logarítmica da transmitância (T):

$$A = -\log T$$

Conforme a equação acima a medida de transmitância origina um gráfico polinomial; como o objetivo é determinar uma faixa linear de resposta, usa-se a medida de absorvância, para que ao se plotar dados de absorvância contra outros dados lineares (como concentração) num gráfico, a curva obtida seja exemplificada numa equação de 1º grau. Com

base nessa conclusão, pode ocorrer que alguns dados de absorvância não pertençam à linearidade proposta, não sendo considerados para o cálculo proposto de IC₅₀%.

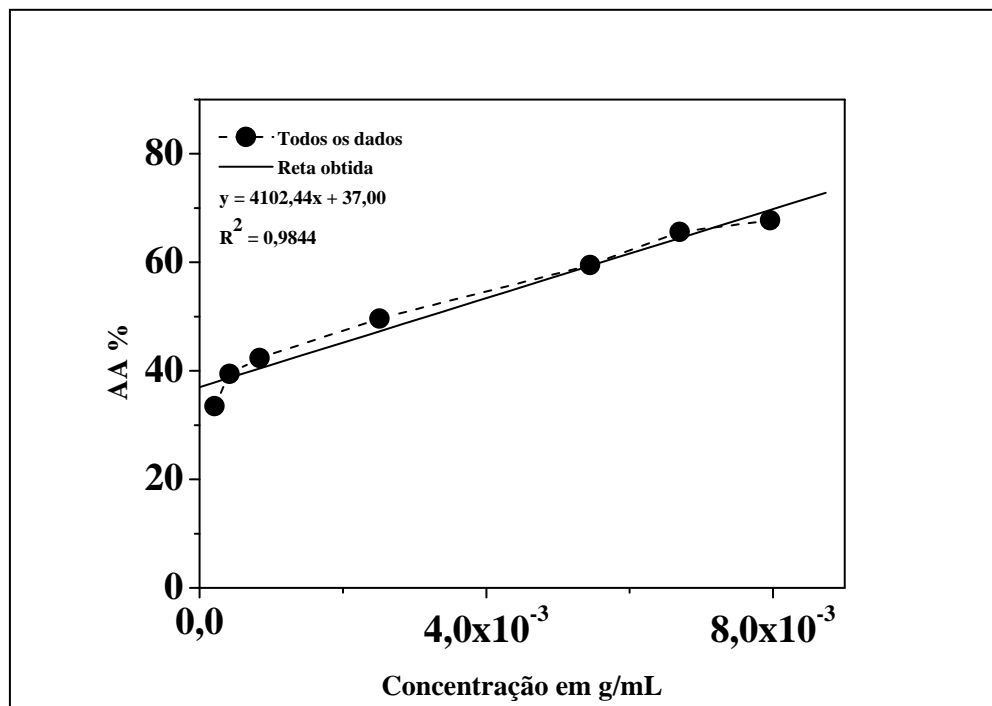


Figura 17 Gráfico da concentração em g/mL de extrato etanólico do óleo essencial das folhas de canela versus AA % no decorrer do tempo.

Nesse intervalo linear foi determinada a equação de reta de primeiro grau e, com isso, qual a concentração de extrato etanólico do óleo em estudo capaz de inibir a metade da quantidade de DPPH no teste (IC₅₀ %).

De acordo com a equação de reta obtida com esses dados que foi de $y = 4102,44x + 37,00$, verificou-se que a concentração necessária de extrato etanólico do óleo de canela para inibir 50 % da solução de DPPH a 0,3 mM é de $3,1696 \times 10^{-3}$ mg/mL. Para cada concentração do extrato etanólico foi determinada a concentração inibitória como mostra a Tabela 5.

3.7 Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial das folhas da canela.

A Tabela 6 apresenta o resultado da análise do óleo essencial extraído das folhas de canela feito por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas que indicou os prováveis constituintes e as suas concentrações na espécie *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Tabela 6 Compostos identificados na amostra óleo essenciais extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela).

Pico ¹	t _{RET} ²	Nomes do Composto ³	% A ⁴	Qualidade ⁵
1	18,53	2-Metil-5-(Metiletenil)-Ciclohexanol	2,14	81
2	24,68	Cinamaldeído	1,70	93
3	27,89	Eugenol	87,36	AMDIS
4	29,69	Trans-Cariofileno	6,31	92
5	30,74	Alfa-Cariofileno	1,05	83
6	34,63	Farnesol	1,45	85

¹ Número do pico pela ordem de eluição da coluna.

² t_{RET} = Tempo de retenção do composto na coluna em minutos.

³ Nome mais comum do composto identificado.

⁴ %A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

⁵ Qualidade é o índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas. Adotam-se sempre índices de qualidade >70.

De acordo com a metodologia utilizada foi possível identificar 100% de composição total do óleo. A classe aromática está representada por dois compostos, o eugenol, como mostra a Tabela 6, é o composto majoritário (87,37%) e Cinamaldeído (1,70%), enquanto a fração monoterpênica está representada pelos compostos 2-Metil-5-(Metiletenil)-Ciclohexanol (2,14%) Farnesol (1,45%). A fração sesquiterpênica está representada pelos compostos Trans-Cariofileno (6,31%) e Alfa-Cariofileno (1,05%) totalizando 7,36% do total da amostra do óleo em estudo. As fórmulas estruturais dos compostos identificados estão dispostas na Figura 18.

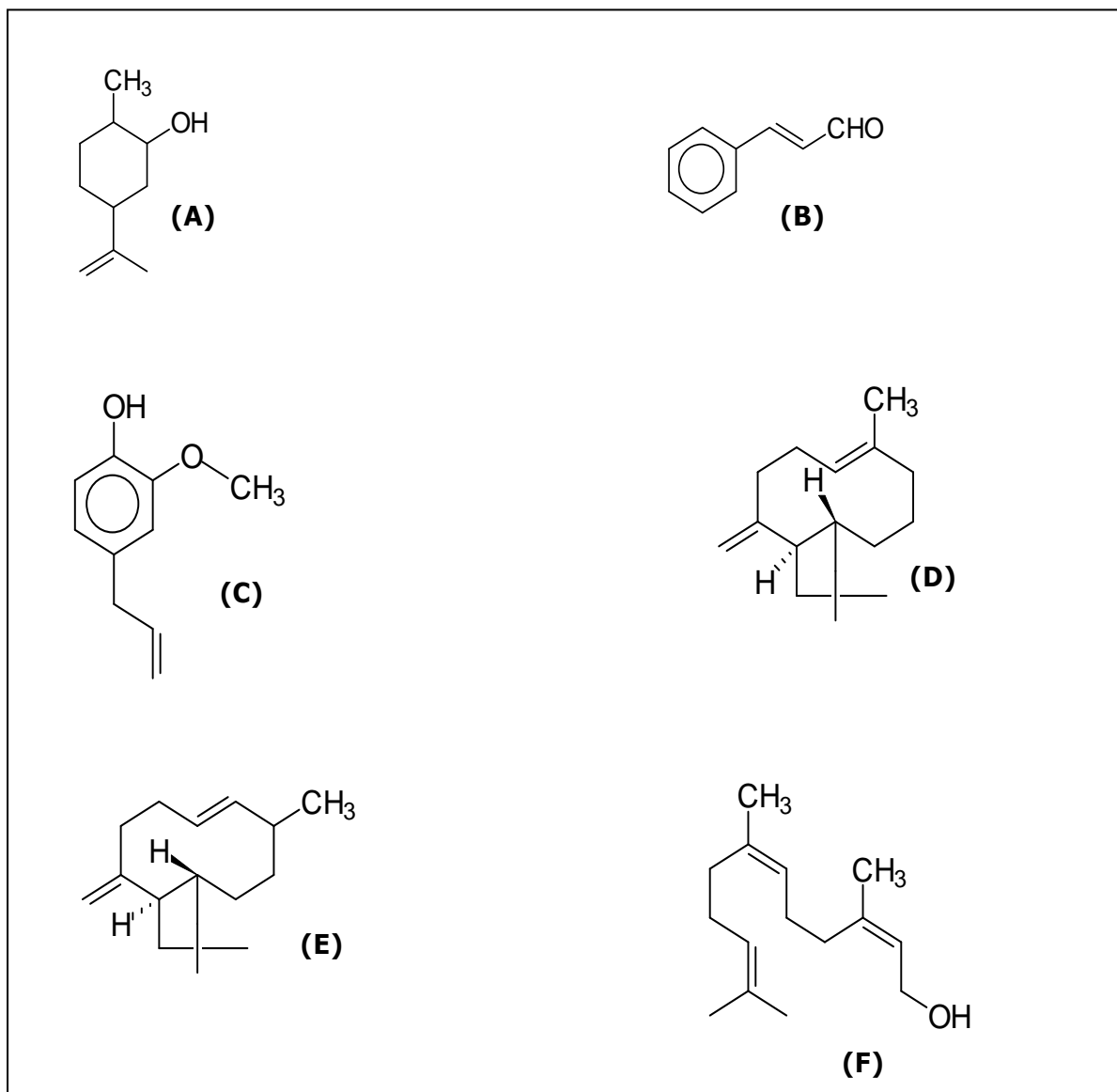


Figura 18. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das folhas de canela **(A)** 2-Metil-5-(Metiletenil)-Ciclohexanol, **(B)** Cinamaldeído, **(C)** Eugenol, **(D)** Trans-Cariofileno, **(E)** Alfa-Cariofileno e **(F)** Farnesol.

O composto majoritário eugenol, identificado no óleo essencial extraído das folhas da canela como mostra a tabela 6, segundo a literatura apresenta propriedades comprovadas como, bactericida, fungicida, anestésico, anti-séptico, anticoagulante, antioxidante, inseticida, repelente, efeito alelopático, e na produção de outros fenólicos como a vanilina.

3.8 Avaliação antibacteriana do óleo *Cinnamomum zeylanicum*

3.8.1 Análises da zona de inibição do óleo

A Figura 19 apresenta o gráfico referente à ação antibacteriana do óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* avaliada pelo método de difusão de discos.

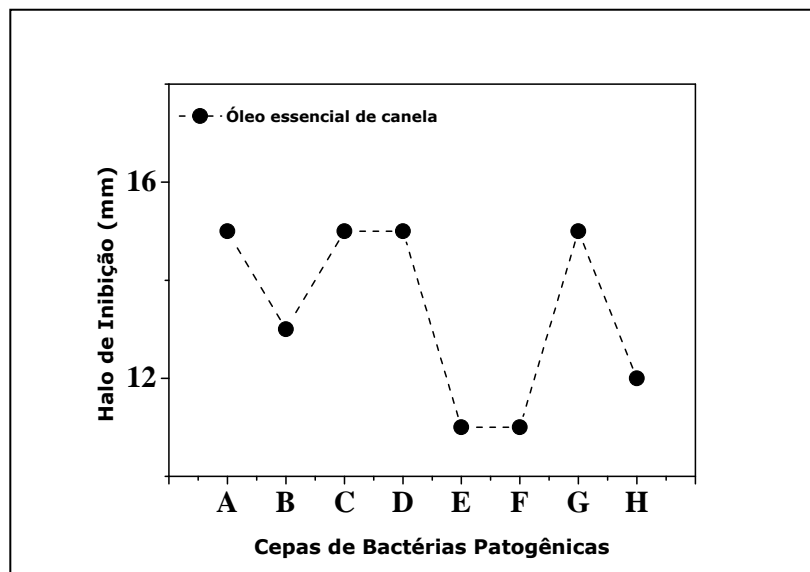


Figura 19 Gráfico da zona de inibição referente à atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas da canela (: **A** = *Escherichia coli* (padrão); **B** = *Escherichia coli* (alface); **C** = *Escherichia coli* (ambiente); **D** = *Staphylococcus aureus*; **E** = *Listeria monocytogenes*; **F** = *Pseudomonas aeruginosa*; **G** = *Serratia odorífera* e **H** = *Proteus mirabilis*).

Como se podem observar na Figura 19 os halos de inibição encontrados variou de 11 a 15 mm de diâmetro considerando todas as cepas bacterianas testadas.

MOREIRA et al (2005) classificam a sensibilidade dos microrganismos frente à ação dos óleos essenciais de acordo com o tamanho do diâmetro do halo de inibição formado, sendo considerados resistentes (R) halos de inibição com diâmetro inferior a 8 mm e sensível (S), diâmetros de 9-14 mm. Dessa forma, de acordo com a Figura 19 observou-se que todas as cepas testadas foram sensíveis à ação do óleo essencial de canela.

Dentre as bactérias testadas as que apresentaram maior sensibilidade frente à ação do óleo foram: *Escherichia coli* padrão ATCC 25922, *Escherichia coli* isolada de ambiente, *Staphylococcus aureus* e *Serratia odorífera* todas com zona de inibição de 15 mm (ver apêndice, Figura 20, página 86).

Em geral, os dados desta pesquisa mostraram que o óleo essencial de canela apresentou maior eficiência frente às cepas gram negativa, apesar de a cepa *Staphylococcus aureus*, por ser gram positiva, também se mostrar susceptível ao óleo em estudo, no qual esta de acordo com os trabalho de NOGUEIRA et al. (2008), no qual mostram que os óleos essenciais são mais efetivos contra bactérias gram positiva do que gram negativa.

Outro fator interessante é que a atividade de óleos essenciais de extratos de planta em estudo contra bactérias patogênicas pode ser referida à presença de fitoconstituintes.

3.8.1.1 Análises da variância do tamanho do halo (mm)

De acordo com a análise estatística do tamanho dos halos das cepas testadas, houve diferenças entre as cepas, como pode ser observado na Tabela 7, respectivamente.

Tabela 7 Análise da variância da zona de inibição do óleo essencial da canela frente às bactérias patogênicas

CEPAS	Médias dos halos (mm)
<i>Escherichia coli</i> (Padrão)	15 ^b
<i>Escherichia coli</i> (Alface)	13 ^c
<i>Escherichia coli</i> (Ambiente)	15 ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	15 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	11 ^f
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 ^e
<i>Serratia odorífera</i>	15 ^a
<i>Proteus mirabilis</i>	12 ^d

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si;

**CV(%) = 0, 51787; Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Mediante a Tabela 7, observou-se ainda, que nas cepas gram-positivas e gram-negativas, houve uma diferença significativa no tamanho dos halos entre as mesmas.

Outro fato interessante, diz respeito às bactérias de *Escherichia coli* (padrão) e *Escherichia coli* isolada da alface, que de acordo com a Tabela 7, apresentou uma diferença significativa com relação à sensibilidade do óleo em estudo.

Segundo ALARCÓN (2007), muitos estudos *in vitro* sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais são realizados, contudo, poucos envolvem a adição dessas substâncias em matrizes alimentares.

De modo geral, fatores intrínsecos e extrínsecos interferem no efeito antimicrobiano dos óleos essenciais e na conduta do microrganismo no alimento.

Em geral, os dados da Tabela 7 mostraram que o óleo essencial de canela apresentou maior eficiência frente às bactérias gram negativas do que bactérias gram positivas apesar de que, a bactéria *S. aureus*, apresentou uma média de halo inibitório de 15mm.

Este fato pode estar relacionado com o caráter hidrofílico da membrana externa presente nas bactérias gram negativas e dos óleos essenciais. De acordo com SERRA (2008), essa característica hidrofílica dos óleos essenciais, permite dividir os lipídios da membrana celular da bactéria das mitocôndrias, perturbando a estrutura celular e aumentando a sua permeabilidade. Dessa forma, a morte celular ocorre devido a um largo vazamento nas células bacterianas ou a perda de moléculas e íons essenciais.

3.9 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial da canela

De acordo com a Tabela 8 apresentam-se os resultados referentes à concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial do *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

Tabela 8 Concentração inibitória mínima do óleo essencial de canela frente a bactérias patogênicas.

CEPAS	Concentração Inibitória Mínima	
	% (v/v)	µg/mL
<i>Escherichia coli</i> (Padrão)	0,125%	1,0
<i>Escherichia coli</i> (Alface)	0,125%	1,0
<i>Escherichia coli</i> (Ambiente)	0,125%	1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5%	420
<i>Serratia odorífera</i>	0,125%	1,0
<i>Proteus mirabilis</i>	0,25%	2,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,125%	1,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25%	2,0

A menor concentração inibitória mínima encontrada foi de 0,125% para a cepa de *Escherichia coli* padrão, *Escherichia coli* isolada da alface, *Escherichia coli* isolada do ambiente e *Serratia odorífera*. Enquanto que *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* a CIM foram respectivamente, 0,5% e 0,25%. As patogênicas gram positivas, ou seja, *Staphylococcus aureus* e *Listeria* foram sensíveis (Figura 21) com CIM respectivamente, 0,125% e 0,25%.

Mediante a Tabela 8 pode-se constatar que o óleo em estudo se apresenta como agente antimicrobiano em potencial, já que as CIM correspondentes a cada %v/v são baixas variando entre 1 a 2µg/mL com exceção da cepa *Pseudomonas aeruginosa* que necessitou de 420µg/mL para se tornar sensível ao óleo.

É de suma importância salientar que o óleo essencial de canela tem como constituinte majoritário o eugenol e provavelmente é essa

substância responsável pela comprovação da atividade antibacteriana da planta *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.

3.10 Susceptibilidade dos antibióticos comerciais versus o óleo essencial da canela.

A sensibilidade das cepas testadas aos antibióticos comerciais está apresentada na Tabela 9. A ação dos antibióticos foi avaliada com base nos parâmetros descritos na Tabela 10 (ver apêndice, página 87).

De acordo com a Tabela 9 as cepas de bactérias gram positivas, *Staphylococcus aureus*, foi resistente apenas para a penicilina, enquanto que aos demais antibióticos a bactéria foi sensível. A *Listeria monocytogenes*, se apresentou sensível aos antibióticos tetraciclina-TET, cloranfenicol-CLO e gentamicina-GEN, entretanto foi resistente a penicilina-PEN, cefalotina-CEF e vancomicina-VAN.

JELJASZEWICZ, MLYNARCZYK e MLYNARCZYK (2000) mencionam que as bactérias gram positivas são mais sensíveis à ação dos antibióticos do que bacilos gram negativos, devido à falta da membrana externa, o que facilita a atuação da droga. Entretanto, bactérias gram positivas têm maior facilidade de adquirir uma resistência intrínseca às drogas que são utilizadas rotineiramente. Estes dados corroboram os resultados encontrados nesta pesquisa.

Tabela 9 Efeito dos antibióticos comerciais sobre a ação antibacteriana mediante as cepas de bactérias patogênicas.

CEPAS	Halo de inibição (mm)							
	TET	CLO	PEN	CFL	VAN	GEN	OEC	
<i>Escherichia coli</i> (Padrão)	7 (R)	20 (S)	-	16 (I)	-	16 (S)	15 (I)	
<i>Escherichia coli</i> (Alface)	16 (I)	23 (S)	-	12 (R)	-	14 (I)	13 (R)	
<i>Escherichia coli</i> (Ambiente)	15 (I)	17 (I)	-	15 (I)	-	16 (S)	15 (I)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (R)	23 (S)	-	0 (R)	-	14 (I)	11 (I)	
<i>Serratia odorífera</i>	15 (I)	14 (I)	-	0 (R)	-	14 (I)	15 (I)	
<i>Proteus mirabilis</i>	14 (R)	16 (I)	-	13 (R)	-	14 (I)	12 (R)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	23 (S)	22 (S)	28 (R)	29 (S)	16 (S)	21 (S)	-	
<i>Listeria monocytogenes</i>	19 (S)	21 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	18 (S)	-	

Nota: TETRACICLINA-TET (30µg), CLORANFENICO-CLO (30µg), PENICILINA-PEN (10µg), CEFALOTINA-CEF (30µg), VANCOMICINA-VAN (30µg), GENTAMICINA-GEN (30µg) e ÓLEO ESSENCIAL DE CANELA-OEC (75µL), R: Resistente; I-Intermediário; S-Sensível.

HANSEN et al. (2005), examinaram a susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes em Denmark. As cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, incluindo penicilina, ampicilina e sulfametoxazole, com exceção a ciprofloxacina, cujas cepas demonstraram sensibilidade moderada.

As bactérias gram negativas apresentaram de modo geral um comportamento diversificado perante aos antibióticos utilizados: a *E.coli* (padrão) foi sensível apenas aos antibióticos cloranfenico-CLO e gentamicina-GEN, resistente ao tetraciclina-TET e intermediário a cefalotina-CFL.

Escherichia coli (Alface), apresentou sensível a cloranfenico-CLO, resistente ao cefalotina-CFL e manteve-se intermediária aos antibióticos tetraciclina-TET e gentamicina-GEN. No entanto a *Escherichia coli* (Ambiente) teve um comportamento intermediário para os seguintes antibióticos: tetraciclina-TET, cloranfenico-CLO e cefalotina-CFL. Enquanto que, na presença do antibiótico gentamicina-GEN se mostrou resistente.

A disparidade encontrada na sensibilidade de cepas de *E.coli* isoladas de substratos diferentes aos antibióticos comerciais, pode ser em decorrência de mutações em seus genes e/ou pela aquisição plasmídios de resistência de outras bactérias da mesma espécie, ou eventualmente, de outras espécies quando submetidas a condições ambientais adversas ao do seu habitat natural (MOTA et al, 2005).

Quanto à cepa *Pseudomonas aeruginosa*, apenas foi sensível a cloranfenico-CLO, resistente aos tetraciclina-TET e cefalotina-CFL, sendo intermediária a gentamicina-GEN. Enquanto que, as cepas de *Serratia odorífera* e *Proteus mirabilis* não apresentaram sensibilidade a nenhum dos antibióticos testados.

A resistência bacteriana aos antibióticos comerciais é um fato emergente que atinge diretamente a saúde pública e o estudo de novos princípios ativos a base de produtos naturais tem sido estimulada nos últimos anos. Dessa forma, os dados encontrados nesta pesquisa revelam

que o óleo essencial extraído das folhas da canela apresenta-se como uma alternativa para a medicina terapêutica.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos com bases nas condições experimentais pode-se concluir que:

✚ As folhas de canela possuem teores nutricionais significativos, o que permite a sua utilização como um componente adicional na formulação de outros alimentos, tais como, as multimisturas, por ser uma fonte de nutrientes, baixo custo e acessível às populações rurais e urbanas;

✚ A alta atividade antioxidante obtida para os extratos do óleo de canela nas diversas concentrações testadas é justificada pela presença majoritária do composto eugenol;

✚ Portanto de acordo com os resultados obtidos o óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* (canela) pode ser considerado um antioxidante natural podendo ser utilizada em indústria de alimentos, farmacêuticas e cosméticas;

✚ O extrato etanólico do óleo essencial das folhas de canela possui composto bioativo que apresenta uma potente ação antioxidante, pois exibiu a maior atividade antioxidante e a mais elevada capacidade de seqüestrar o radical DPPH;

✚ O óleo essencial extraído das folhas da canela demonstrou-se um eficiente agente antibacteriano, tanto aplicado puro, quanto diluído, frente às bactérias testes;

✚ O óleo essencial da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela) demonstrou uma ação antibacteriana frente às bactérias testadas a partir da menor concentração aplicada (0,125%). Fato extremamente relevante, uma vez que apresentou uma atividade inibitória tanto para as bactérias gram positivas quanto para gram negativas;

✚ A atividade antibacteriana do óleo essencial de canela frente às bactérias deve-se à presença de fitoconstituintes, no caso eugenol;

✚ De acordo com os resultados obtidos da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn, o uso desta planta medicinal, é de grande relevância, pois é uma alternativa terapêutica promissora em futuro próximo, sobretudo para a população mais carente.

4.1 Considerações para trabalhos futuros

Para melhor interpretação dos resultados aqui encontrados sobre o óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (Canela), poderão ainda ser realizados:

✚ Estudos relacionados com a toxicidade da planta;

✚ Aplicabilidade do óleo de canela como antioxidante em alimentos;

✚ Comparação da eficiência da ação do óleo de canela como antioxidante com alguns desinfetantes comerciais, utilizando as bactérias aqui estudadas, assim como, outras bactérias patogênicas que ainda não foram testadas;

✚ Avaliar a ação do óleo essencial da canela frente outras bactérias oriundas dos mais diversos tipos de alimentos;

✚ Utilizar o óleo essencial extraído das folhas da canela para estabilidade de oxidante do biodiesel.

CAPIΤULO V

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, P. R. S. *Ocorrência de listeria monocytogenes e de outros microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na região metropolitana de Curitiba*. Paraná, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado), 106p.

ABREU, G. T. de; SCHUCH, L.O.B.; MAIA, M. de S. Análise do crescimento e utilização de nitrogênio em aveia branca (*Avena sativa* L.) em função da população de plantas. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v.8, n.2, p.111-116, 2002.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; SCHAEFER, C. E. G, R. Contaminação química e biorremediação do solo In: (Ed.) *Tópicos em ciência do solo*, Viçosa v.1 p.299-352, 2002.

ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; NOGUEIRA, C. M. D. ; MAGALHÃES, C. E. C.; MORAIS, N. M.T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais, *Ciências Tecnologia Alimentos*, Campinas, **22(1): 94-97, 2002.**

ALARCÓN, M.M.V. *Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de Staphylococcus aureus e Escherichia coli em queijo ricota*. Minas gerais, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, 2007. Dissertação (Mestrado), 56p.

ALTERTHUM, F. **Mecanismo de ação dos antibacterianos e Mecanismos de resistência**. In: TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F.(Orgs). *Microbiologia*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, p.175-188, 2004.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soil**. 2ª ed. London: Blackie Academic, 1995, p.368.

ANGELO, P.M.; JORGE,N. Evaluation of stored sunflower oil with the addition of antioxidants. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **28(2): 498-502, 2008.**

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005

BATAGLIA, O. C.; SANTOS, W. R. dos. Estado nutricional de plantas perenes: avaliação e monitoramento. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 96, p. 1-8, dez. 2001.

BALMÉ, F. Plantas Medicinais. São Paulo: Hemus, 1978

BRASIL. Portaria nº 108. 4 set. 1991. Normas gerais de amostragem para análise de rotina. Método número 11 – Fibra Bruta. Diário Oficial [República Federal do Brasil], Brasília, p.19813, 17 set. 1991, Seção 1.

BELTRÃO, N. E. de M. Informações sobre o biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 2004. p. (Comunicado Técnico, 177).

BENARROZ, M.O.; FONSECA, A.S.; ROCHA, G.S.; FRYDMAN, J.N.G.; ROCHA, V.C.; PERREIRA, M.O.; BERNARDO-FILHO, M. Cinnamomum zeylanicum extract on the radiolabelling of blood constituents and the morphometry of red blood cells: in vitro assay. Applied Radiation and Isotopes, Publisher: Elsevier Ltd., CODEN: ARISEF ISSN: 0969-8043. *Journal written in English*. AN 2007: **66(2), 139-146, 2008**.

BERNARD, T., PERINEAU, F., DELMAS, M., GASSET, A. 1989. Extraction of essential oils by refining of plant materials. II. Processing of products in the dry state: Illicium verum Hooker (fruit) and Cinnamomum zeylanicum Nees (bark). *Flav. Fragr. J.*, **4: 85-90**.

BULLERMAN, L. B.; LIEW, F. Y.; SEIER S. A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science, Chicago*, v. **42**, n. **6**, p. **1107-1109**, **Nov./Dec. 1977**.

CARNEIRO, C.; REISSMANN, C.B.; MARQUES, R., Comparison of methods for chemical analysis of K, Ca, Mg e Al, in maté tea tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) Lavras, v. **12**, n. **2**, p. **113-122, 2006**.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; FILHO, N. D.; BERTOLUCCI, S. K. V. 2001. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral química e medicinal**. Lavras: UFLA. 81 p.

COSTA, C.T.C. *Atividade anti-helmíntica de Azadirachta indica A. Juss sobre nematóides gastrintestinais de ovinos*. Ceará, Faculdade de Veterinária, U.E.C., 2004, Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), 60p.

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

CONNER, D. E.; BEUCHAT, L. R. Sensitivity of heatstressed yeasts to essential oils of plants. *Applied Environmental Microbiology, Washington*, v. **47**, n. **2**, p. **229-233, Feb. 1984b**.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; PIZZALITTO, A.C.; LARA, E.H.G.; MORAIS, H.P. Pharmacognostical evolution and antibacterial activity of plants extracts used in tooth gel. *Revista Brasileira de Planta Medicinaiis*, v.**8**, n.**4**, p.**173-182, 2006**.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, **Perfomance Sandards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard: 10 ed, v.29, n.1, 2009.

DIAS, L. A. *Uso do ácido indolbultírico para induzir a formação de raízes adventícias em estacas caulinares de canela (C.zeylanicum)*. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, 2006. monografia de graduação, 44p.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 231p, 1996.

DOQ-CGGCREE-008-Revisão 01-Março/2003. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.

DIAS, V. L. N.; NASCIMENTO, A. R.; SOUZA, A. G.; MARTINS, A. G. L. A. **Determinação Nutricional das folhas Cinnamomum zeylanicum(Canela)**. (artigo aceito pela revista Higiene Alimentar, 15/dez /2008b). in press.

DME. Diagnósticos Microbiológicos Especializados. Discos para antibiograma. **Polisensidisc**. Disponível:< <http://www.bacdme.com.br>>. Acesso: 03/03/2009.

EPSTEIN, E. ; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas, princípios e perspectiva**. 2ºEd. Editora Planta, 2006, p.401.

FAO. 1995. Flavours and Fragrances of Plant Origin: Non-Wood Forest Products. Chapter 2. Cinnamomum Oils (including Cinnamon and Cassia). <http://www.fao.org/>. Acesso: maio/2004.

FREIRE, J.M. *Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: Caracterização química e atividade biológica sobre Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Aspergillus flavus e Aspergillus parasiticus.* Larvas, Universidade Federal de Larvas, 2008. Dissertação (Mestrado), 68p.

FONTES, P.C.R. (2001) **Diagnóstico do estado nutricional pelo método visual.** In: Fontes, P.C.R. *Diagnóstico do estado nutricional das plantas.* Viçosa: Editora UFV, cap. 8, p.63-86.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.**

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; GRÄF, T.; CORÇÃO, G. Pseudomonas aeruginosa: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **41(5):470-473, 2008.**

GIRARD, E. A. *Volume, biomassa e rendimento de óleos essenciais do craveiro (Pimenta pseudocaryophyllus (gomes) landrum) em floresta ombrófila mista.* Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2005, Dissertação (Mestrado), 60p.

GONÇALVES, F. de A. *Fertilidade e fitodisponibilidade de metais pesados em solo com resíduo de sucata automobilística.* Campinas, Agricultura, Tropical e Subtropical Instituto Agrônômico, 2008. Dissertação (Mestrado), 89p.

GÓMEZ, M. E. D. B. *Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta.* São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, USP, 2003. Tese (Doutorado), 149 p.

GOMES, M.R.; SOLEDAD, C.; OLSINA, R.A.; SILVA, M.; MARTINEZ, L.D. Metal content monitoring in Hypericum perforatum pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **34:569-576, 2004.**

GUENTHER, E. Oil of Cinnamon. In: *The Essential Oils.* New York: D. Van Nostrand, **v.4, p. 213-240, 1950.**

HANSEN, J. M. et al. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS*, **v. 113, p. 31-36, 2005.**

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; CREGO, A. L.; SEÑORÁNS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO, G. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal Agric. Food Chem.*, **v. 48, n. 9, p. 4060-4065, 2000.**

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz.** 4 ed. São Paulo, 2005.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JELJASZEWICZ, J.; MLYNARCZYK, G.; MLYNARCZYK, A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **n. 16, p. 473-478, 2000.**

JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., RUZICKA, J., SHAFI, M. P., ROSAMMA, M. K. Analysis of *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaf oil from south India. *J. Essent. Oil Res.*, **13: 442-443, 2001.**

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. Institute International Plant Nutrition, *ENCARTE DO INFORMAÇÕES AGRONÔMICAS Nº 118 – JUNHO/2007.*

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. Florida: *CRC Press*, p.315, 2000.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R.; DAISE & MORSEBACH, N.; Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. *Ciênc. Tecnologia Alimentos*, **vol. 17, no. 3, pp. 281-285, 1997.**

KONEMAN, EW; ALLEN, SD; JANDA, WM Schreckenberger PC. **Diagnóstico Microbiológico.** 50 edição. *MEDSI Editora*, Rio de Janeiro, 2001.

LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A. M.; McCHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. *Phytotherapy Research, Chichester*, **v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.**

LIMA, R. K., *Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de folhas de goiabeira sobre a lagarta-do-cartucho do milho.* Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. Tese (Mestrado em Agronomia), 57p.

LIMA, M.P.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, T. M.D.; FERNANDES, C. S., Volatile constituents from leaves and branches of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Acta Amazônica*, **v.35 no. 3, 2005.**

LULLEZ, J. C. *Identificação de metileugenol, eugenol e chavibetol no óleo essencial da folha de Pseudocaryophyllus acuminatus (Limk) Burret.* Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1991. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), 124p.

LOPES, M.F.G., ALMEIDA, M. B., NOGUEIRA, C.M.D., MORAIS, N.M.T., MAGALHÃES, C.E.C., Estudo mineral de plantas medicinais. *Ver. Brás. Farmacogn.*, **v. 12, p.115-116, 2002.**

MAGALHÃES, C.E.C. *Emprego de Técnicas Espectroscópicas de Análise para a Determinação de Alumínio e Selênio em Amostras Alimentícias/Ambientais na Forma Líquida ou em Suspensões.* Campinas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2000. Tese de Doutorado. 99p.

MALAVOLTA, E., VITTI, G. C. & OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba, Potafos, 1989. 201 p.

MASSEY, R.; TAYLOR, S. 1991. **Aluminium in Food and the Environment.** Royal Society of Chemistry, London.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais, guia de seleção e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil,** Fortaleza: EUFC, 1989. 164p.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Fortaleza: EUFC, 1988. 125p.

MARINI, L.J. GUTKOSKI, L.C; ELIAS, M.C; MEZZOMO, N. Efeito da secagem intermitente na estabilidade de grãos de aveia. *Brazilian Journal of Food Technology*, **v.8, n.3, p.260-267, 2005.**

MORESCHI, P.E.; MICHELIN, D.C.; A.C. LIMA, G. G. F.; NASCIMENTO, M.O. PAGANELLI, M.V.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **15 (4): 316-320, 2005.**

MONTANARI, J.I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais:** CPQBA - UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas), 2002.

MÖLLENBECK, S., KÖNIG, T., SCHREIER, P., SCHWAB, W., RAJAONARIVONY, J., RANARIVELO, L. Chemical composition and analyses of enantiomers of essential oils from Madagascar. *Flav. Fragr. J.*, **12: 63-69, 1997.**

MORSBACH, N.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. O. L. ; LOPES, D. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*cinnamomum verum* presl) cultivada no Paraná , *Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas*, **v. 17, n. 3, 1997.**

MONTARANI, C. A & BOLZANI, V. S. Planejamento Racional de fármacos baseado em Produtos Naturais. *Química Nova*, **v. 24, n. 1, p.105-111, 2001.**

MONTEIRO, Odair dos Santos. *Caracterização do óleo essencial da Pimenta dióica Lindl e sua aplicação como atrativo de abelhas euglossina*. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 2008. Dissertação (Doutorado), 126p.

MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. 2001. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Kluwer Academic, Dordrecht. 849p.

MORSBACH, N.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. de O.; LOPES, D. Óleos essenciais de cascas e folhas De canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no paraná . *Ciências. Tecnologia de Alimentos.*, **v.17, 1997.**

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, Oxford, **v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.**

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L., PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J vet Res anim Sci*, São Paulo, **v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.**

MENEZES, E. A.; CEZAFAR, F. C.; ANDRADE, M. S. S.; ROCHA, M. V. A. P.; CUNHA, F. A. Frequency of *Serratia* sp in urine infections of intern patients in the Santa Casa de Misericórdia in Fortaleza *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **37:70-71, 2004.**

MENSOR, L. L.; MENEZER, F. S. LEITÃO, G. G.; REIS. A. S. SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. *Phytotherapy Research*, **v. 15, p. 127-130, 2001.**

MELLO, J.C.P de ; DELAPORTE, R.H.; GUZEN, K.P.; TAKEMURA, O.S. Estudo mineral das espécies vegetais *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Bouchea fluminensis* (Vell) Mold. *Rev. bras. farmacogn.* **v. 15, n. 2 p. 133-136, 2005.**

NAPPI, J.A, VASS, E. 2002. Interaction of iron with reactive intermediate of oxygen and nitrogen. *Int J Dev Neurosci* 24: 134-142.

NASCIMENTO, A. R. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (Mytella falcata)*. Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2004. Tese (Doutorado em Microbiologia), 91f.

National Committee for Clinical Laboratory Standards, **Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility testing**; Twelth informational suplement M100-512, vol. 22, nº 01., 2002. – NCCLS.

NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.* **Vol. 74, p.118-124, 2008.**

OLIVEIRA, C. M. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6ªed. Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, 483p.

OMS apóia estudo com plantas medicinais. Disponível em: <http://www.drashi/fitoterapia_oms_apoia_estudos_com_plantas_medicina_is.ht> Acesso em: 17 jul. 2002.

OLIVEIRA, J. P. *Crescimento e nutrição mineral de porta-enxertos de seringueira (Hevea spp.) em função da idade*. Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia), 76p.

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F. F.; KERSUL, C., Sacramento Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. *Bahia Agrícola*, **v.8, n. 1, , p.46, 2007.**

OLIVEIRA, M.B., *Estudo analítico e atividade antibacteriana do óleo essencial extraído do lenho da espécie Aniba duckei Kostermans*. São Luís, Universidade Federal do Maranhão. 2007, Monografia (Graduação), 58f.

PATEL, K.; ALI, S.; SOTHEES WARAN, S.; DUFOUR., J.P. Composition of the leaf essential oil of *Cinnamomum verum* (Lauraceae) from Fiji islands. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, Publisher: Har Krishan Bhalla & Sons, CODEN: JEOPFB ISSN: 0972-060X, **10(5), 374-377, 2007.**

PEREZ, E. *Diagnose fitoquímica dos frutos de Caryocar brasiliense Camb., Caryocaraceae*. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2004, Dissertação (Mestrado)- 99p.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Study of the antioxidant activity and essential oil from wild basil (*Ocimum gratissimum* L.) leaf *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, **27(3): 624-632, 2007.**

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C. ; UENO, M. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Revista de Saúde Pública*, **n.2, v.38, 2004.**

PIRES, A. M. M. *Ácidos orgânicos da rizosfera: aspectos qualitativos e quantitativos e fitodisponibilidade de metais pesados originários de biossólidos*. Tese de doutorado, Piracicaba, p.106, 2003.

PURSEGLOVE, J.W.; BROWN, E.G.; GREEN, C.L. et al. **Cinnamon and cassia**. In: Spices. London: Longman, 1981. 2v. (Tropical Agriculture Series). v.1, p. 100-173.

RAO, Y. R., PAUL, S. C., DUTTA, P. K. Major constituents of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*. *Indian Perfum.*, **32: 86-89, 1988.**

RAMOS, M. J. M. *Caracterização de sintomas de deficiência de Macronutrientes e de boro em abacaxizeiro cultivar Imperial*. Campos, Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, 2006. Tese (Doutorado), 106p.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos, *Química nova*, **v. XY, No. 00, 1-x, 2005.**

SANTOS, R. I. 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org). **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5a. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, p. 403-434.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D.F.; POZZATT, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enteric* sorovars from avian source *Ciência Rural*, Santa Maria, **v.37, n.3, p.803-808, 2007.**

SANTOS, A.L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L.A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *J. Bras. Patol Med. Lab.*, **v. 43, n. 6, p. 413-423, dez., 2007.**

SENANAYAKE, U. M., LEE, T. H., WILLS, R. B. H. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *J. Agric. Food Chem.*, **26: 822-824, 1978.**

SERRA, J. L. *Efeito inibitório do óleo essencial do Eucalyptus sp frente a diferentes cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus.* São Luís, Universidade Federal do Maranhão, Monografia de Graduação. 2008, 53p.

SILVA, F. de A. e S. ASSISTAT Versão 7,5 beta (2008)-Homepage <http://www.assistat.com> DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande – PB. Acesso:em: 11 / março/ 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999, 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Ed. da UFSC: Porto Alegre, 2003, p.1102.

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

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Revista de Higiene Alimentar*, São Paulo, **v.18, n.122, p.32-40, 2004.**

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M., Recent achievements to combat bacterial resistance *Quimica Nova*, **v. 29, No. 4, 844-855, 2006.**

SOARES, M.; WELTER, L.; GONZAGA, L.; LIMA, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Evaluation of antioxidant activity and identification of phenolic acids present in the pomace of Gala variety apples. *Ciências Tecnologia Alimento*. **28(3): 727-732, 2008.**

SOUZA, S. M. C. de; PEREIRA, M. C.; ANGÉLICO, C. L.; PIMENTA, C. J., Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. *Ciências agrotecnicas, Lavras*, **v. 28, n. 3, p. 685-690, 2004.**

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H.R. e; VIEIRA-Jr, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E.D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M. H. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants, *Quimica Nova*, **v.30, No. 2, 351-355, 2007.**

SOUZA, C. O.; DIAS, D. M.; BARBOSA, C.C.S.; RODRIGUES, S. N.; YOSHIDA, P. S., Antimicrobial resistance profile of pseudomonas aeruginosa isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency virus CAD. *SAÚDE COLET., RIO DE JANEIRO*, **15 (3): 379-392, 2007.**

SOARES, A.; VIEGAS, E.C.; CARMO, M.G.F.; ROSSETTO, C.A.V. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, **v.23, n.4, p.915-919, out-dez 2005.**

SCHIPER, L.P. Segredos e virtudes das plantas medicinais. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I. A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immunohistochemical technique *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **v. 39, n. 2, 2003.**

TAIZ, L & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 720p.

THOMAS, J., GREETHA, K., SHYLARA, K. S. Studies on leaf oil and quality of *Cinnamomum zeylanicum*. *Indian Perfum.*, **31: 249-251, 1987.**

VARIYAR, P. S., BANDYOPADHYAY, C. On some chemical aspects of *Cinnamomum zeylanicum*. *PAFAI J.*, **10: 35-38, 1989.**

VERNON, F; RICHARD, H. La canelle. In: Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles. Massy: CDIUPA, 1976. v.2, p. 21-45 (CDIUPA. Serie Syntheses Bibliographiques, 10).

VITTI, A. M. S.; BRITO, J.O.; *Óleo essencial de eucalipto*, São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 2003, n^o 17, 26p.

WILLIAMS, David G. **The chemistry of essential oils**. England: Micelle, 334p, 1996.

APÉNDICE

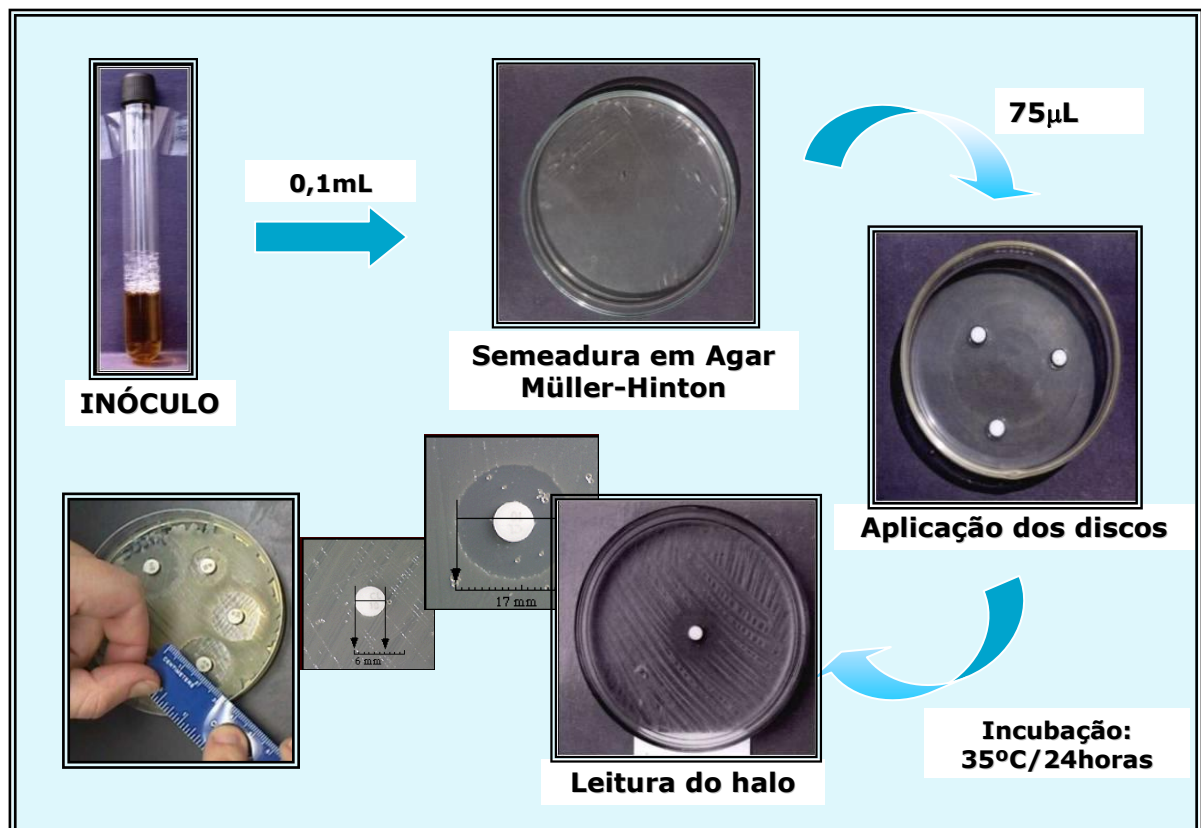
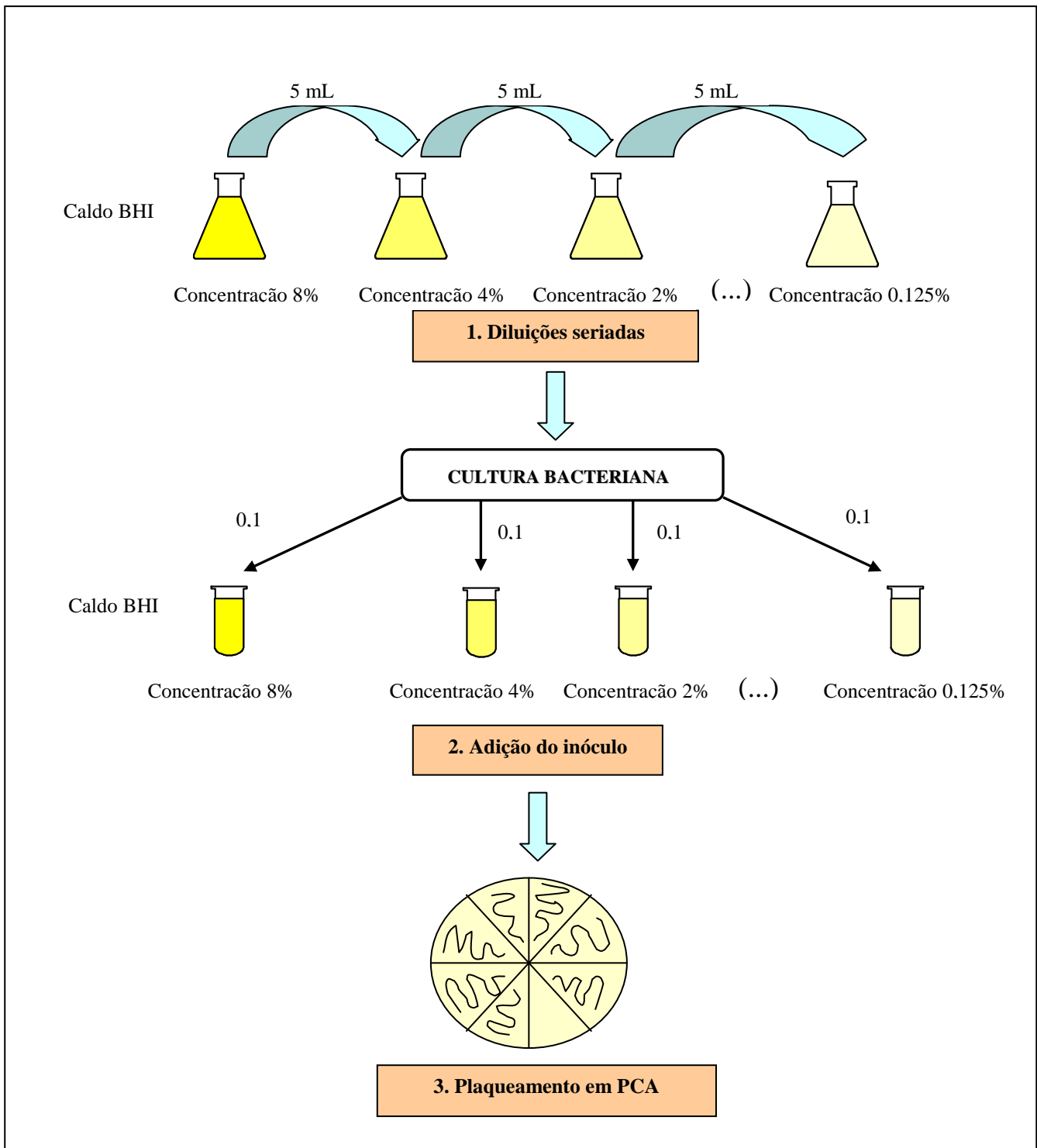


Figura 5 Esquema do método CLSI, 2009.



Fonte: Adaptado de SERRA, 2008.

Figura 6 Método de diluição em caldo.

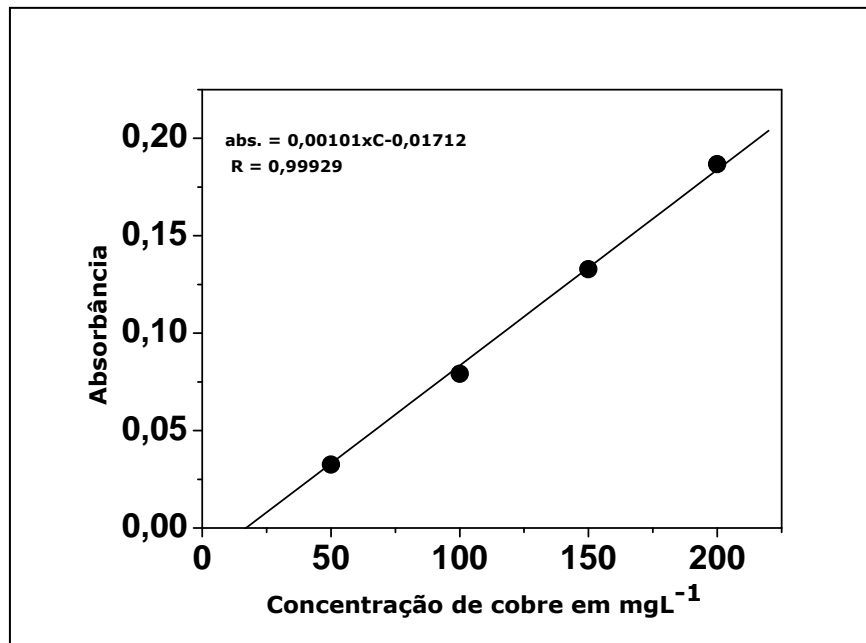


Figura 8 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de cobre.

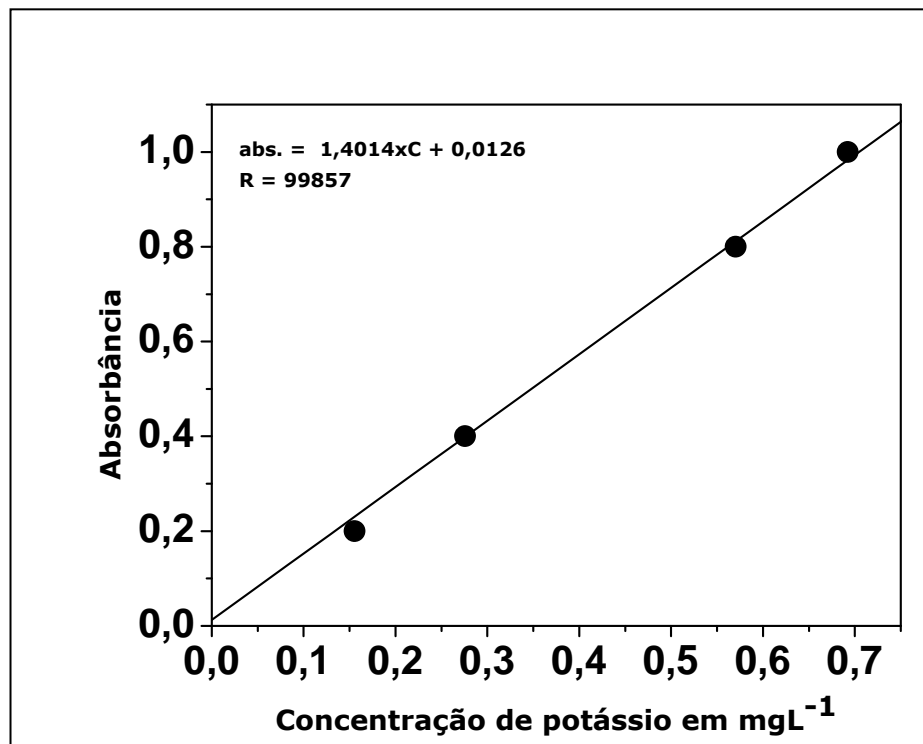


Figura 9 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de potássio.

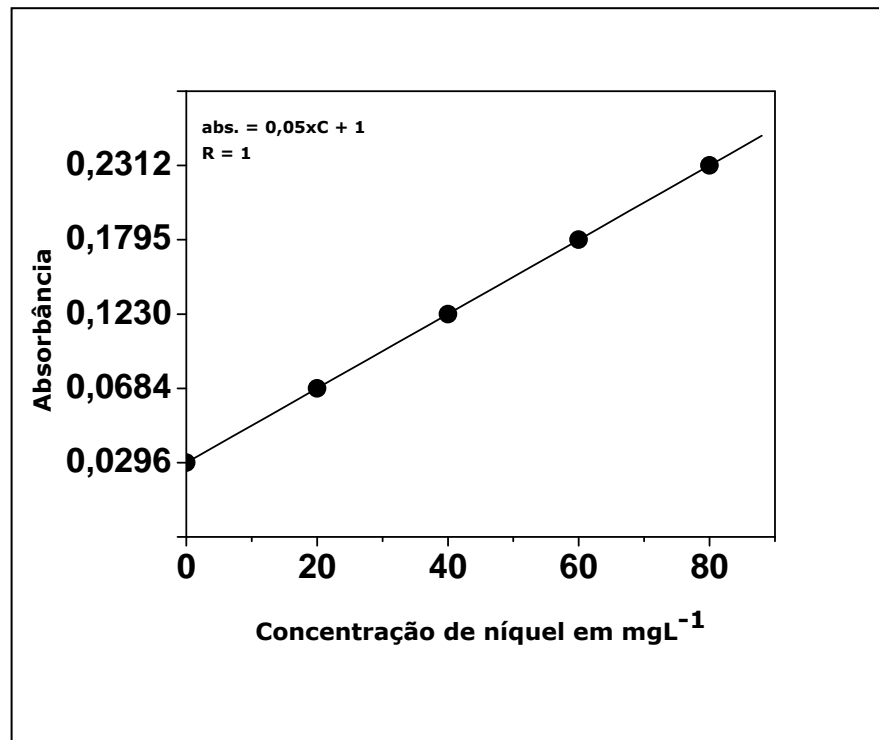


Figura 10 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de níquel.

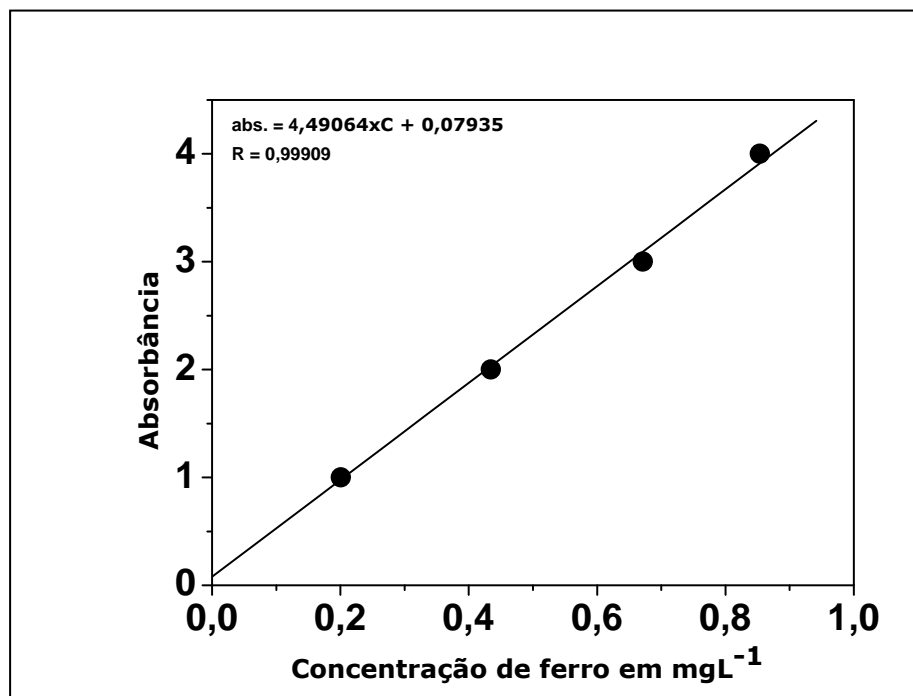


Figura 11 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de ferro.

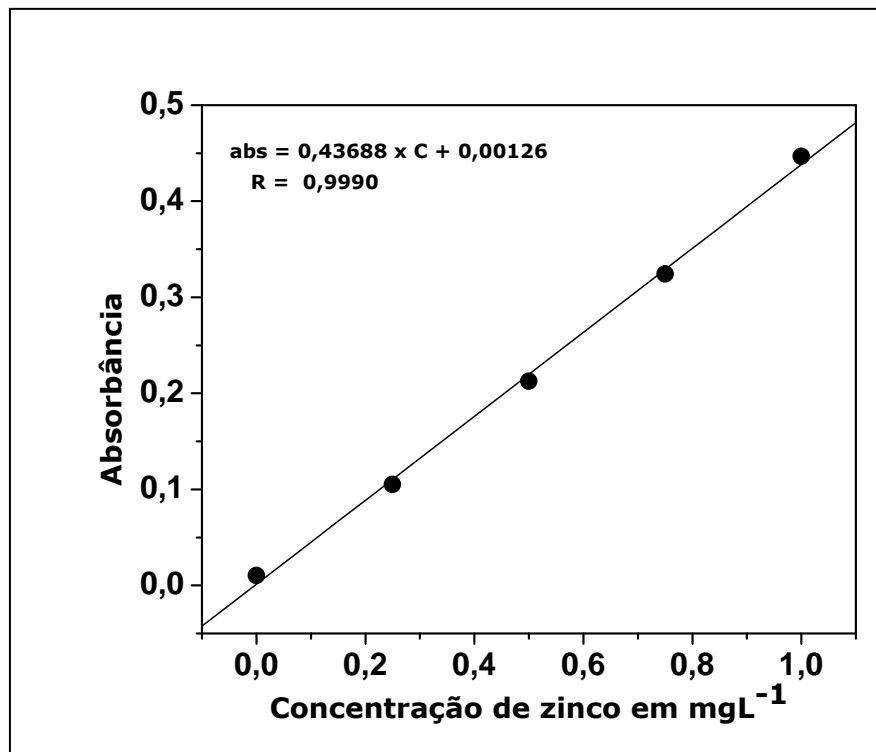


Figura 12 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de zinco.

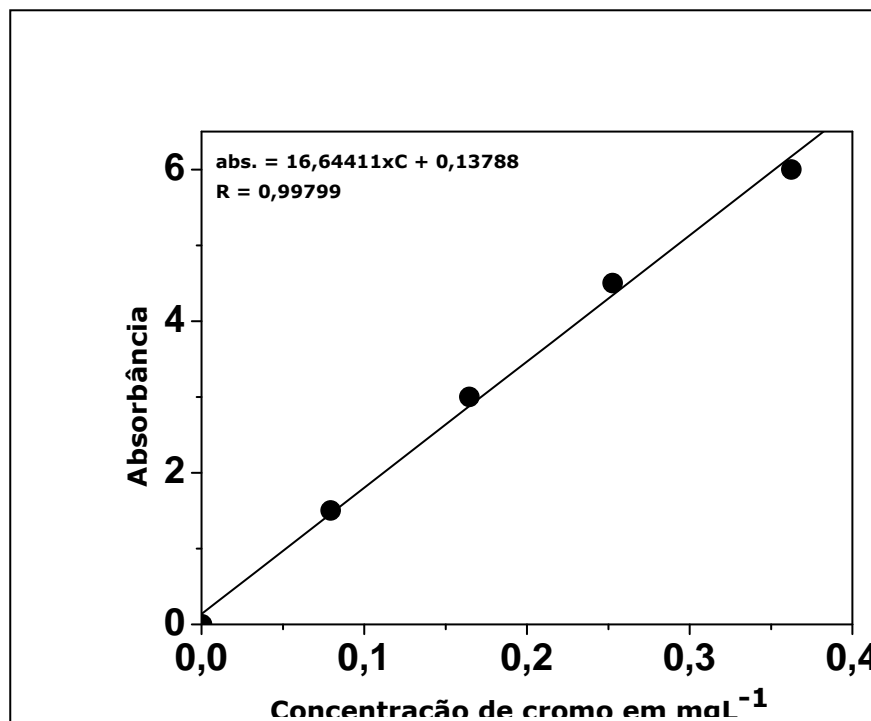


Figura 13 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de cromo.

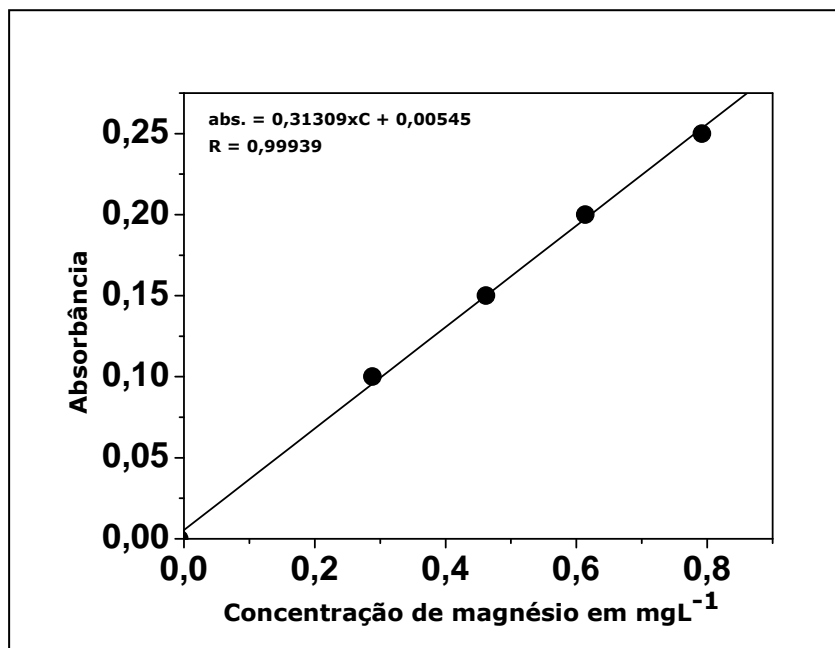


Figura 14 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de magnésio.

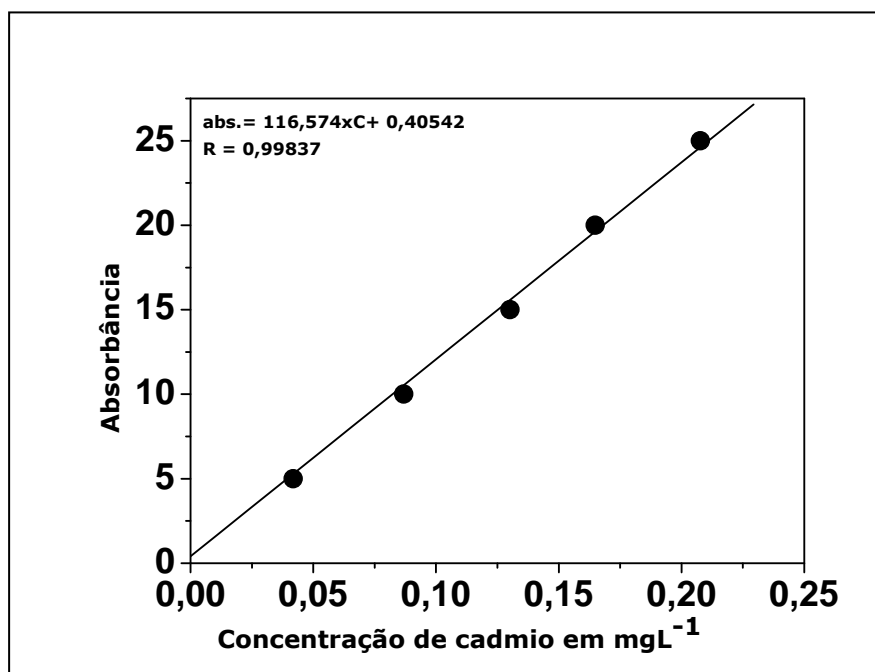


Figura 15 - Curva analítica de adição de padrão da amostras de OE analisadas por EAA-FG para a quantificação de cádmio.

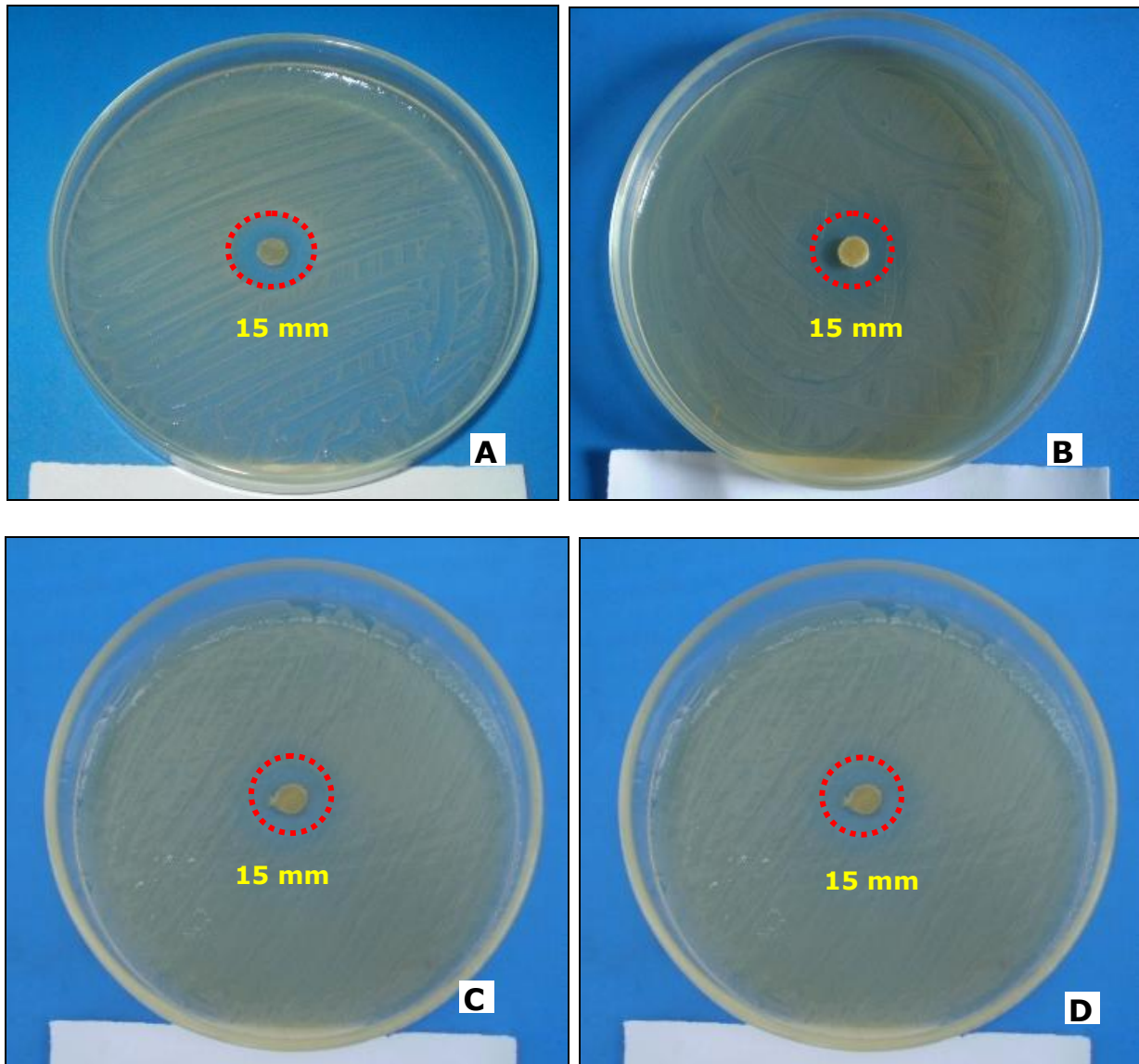


Figura 20 Halo de inibição do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn frente: **A** = *E.coli* padrão ATCC, **B** = *E. coli* isolada do ambiente, **C** = *Staphylococcus aureus* e **D** = *Serratia odorífera*.

Tabela 10 Padrão interpretativo dos antibióticos comerciais.

BACTÉRIAS	Antibióticos	Zona de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
gram negativa	Cefalotina (CFL 30 µg)	=14	15-17	=18
	Cloranfenicol (CLO 30 µg)	=12	13-17	=18
	Gentamicina (GEN 10 µg)	=12	13-14	=15
	Tetraciclina (TET 30 µg)	=14	15-18	=19
	Vancomicina (VAN 30 µg)	=9	10-11	=12
	Penicilina (PEN 10 µg)	=28	-	=29
gram positiva	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Listeria sp</i>	=19	-	=20
	Cefalotina (CFL 30 µg)	=14	15-17	=18
	Cloranfenicol (CLO 30 µg)	=12	13-17	=18
	Gentamicina (GEN 10 µg)	=12	13-14	=15
	Tetraciclina (TET 30 µg)	=14	15-18	=19

Fonte: DME, 2009.

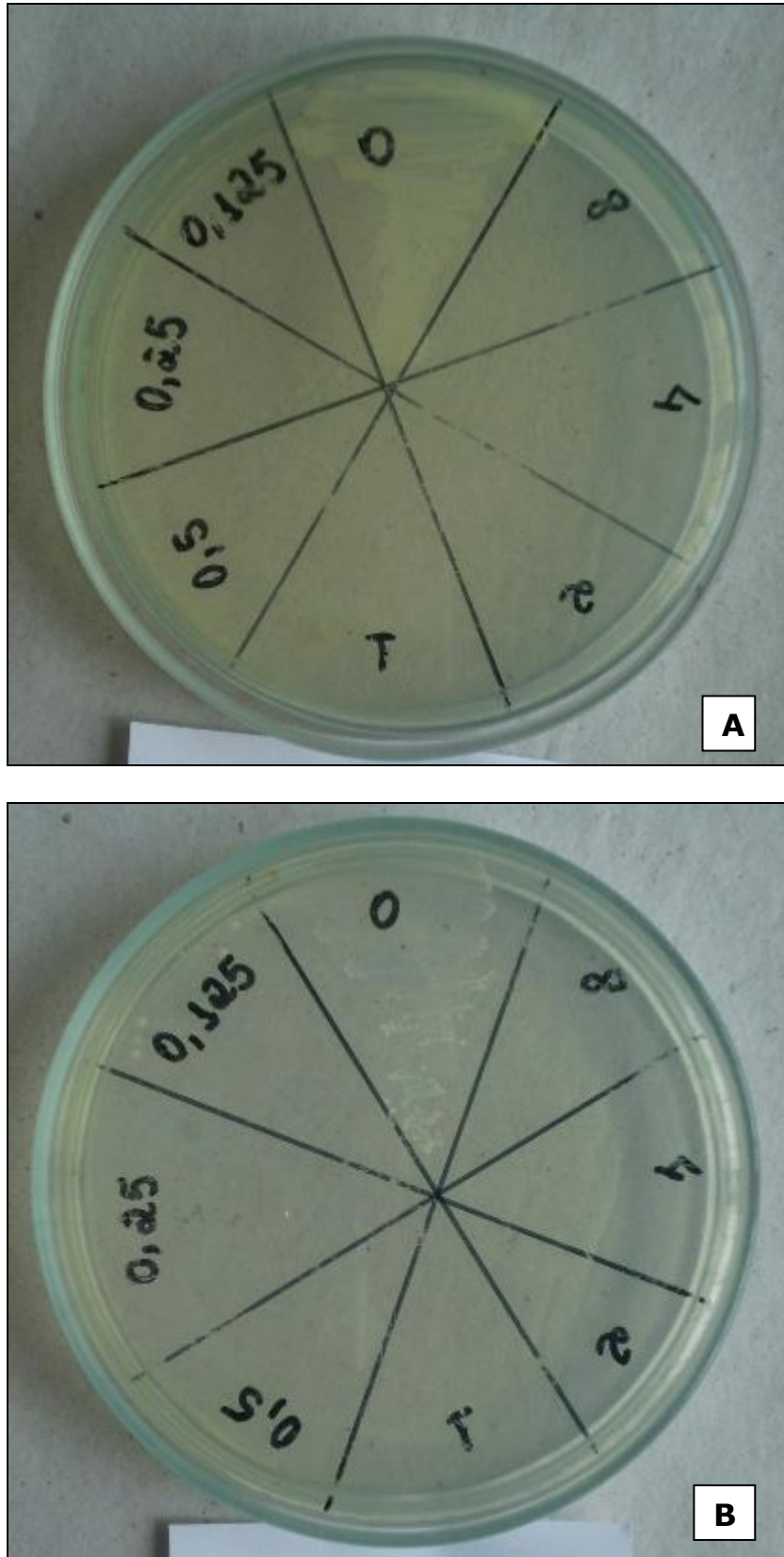


Figura 21 Concentração inibitória mínima do óleo essencial de Canela frente:
A = *Serratia odorífera* e **B** = *Listeria monocytogenes*.