



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

FERNANDA MESSIAS RODELLA

**EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DO CRAVO-DA-ÍNDIA**

Assis
2015

FERNANDA MESSIAS RODELLA

EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL
DO CRAVO-DA-ÍNDIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação.

Orientador: Mary Leiva de Faria

Área de Concentração: Química

Assis
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

RODELLA, Fernanda Messias

Extração e atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia/ Fernanda Messias Rodella. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis, 2015.

80p.

Orientador: Mary Leiva de Faria.

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Cravo-da-índia 2. Óleo essencial 3. Antibiógrama

CDD:660
Biblioteca da FEMA

EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA

FERNANDA MESSIAS RODELLA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto Municipal
de Ensino Superior de Assis, como
requisito do Curso de Graduação,
analisado pela seguinte comissão
examinadora:

Orientador: Prof.^a Dr.^a Mary Leiva de Faria

Analizador: Prof.^a Ms. Elaine Amorim Soares Menegon

Assis
2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por tudo de bom que me concedeu. Aos meus pais, pelo carinho, dedicação, apoio e incentivo a minha formação profissional. E em especial aos meus amigos e professores que levarei para sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem ele nada disso teria sido possível.

Aos meus pais por todo suporte que me deram durante esta caminhada, pelas palavras de conforto quando precisei e que serviram de espelho para o que sou hoje.

A minha tia Cássia por todo apoio e incentivo.

A Mary que além de minha orientadora, foi minha professora e amiga, a quem tenho total admiração e carinho. Obrigada por acreditar no meu potencial.

Aos meus queridos amigos Rafaela, Jean e Lucas que sempre estiveram ao meu lado, valeu pelos momentos bons que passamos juntos. A minha grande amiga Raisal que me fez rir nos momentos mais difíceis ao longo dessa caminhada e por todo apoio e incentivo. Sempre estiveram ao meu lado.

Em especial a professora Elaine por toda a paciência, dedicação e ajuda na realização da parte prática deste trabalho.

Ao meu professor Idécio que foi fundamental para a minha formação. Obrigada por todas as conversas e alegrias compartilhadas.

Aos meus professores Patrícia, Rosângela, Bia, Viviane, Alexandre, Raphael e Ébano que contribuíram diretamente para a minha formação.

A Tia Roberta e a Maristela por toda a força que me deram no estágio.

As minhas amigas Ana e Mariana que mesmo longe sempre estavam dispostas a me ouvir quando precisei.

Ao pessoal do CEPECI, em especial ao Sérgio, Vinicius e Juliana não só pela ajuda, mas também por todas as conversas que compartilhamos.

A Belize, Piero e Rodrigo Castanhas pelo apoio e colaboração.

“Brindo a casa
Brindo a vida
Meus amores
Minha família”

O Rappa

RESUMO

Há muito tempo os produtos de origem vegetal como os extratos e os óleos essenciais têm sido empregados em diversas aplicações na medicina popular. O óleo essencial dos botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), extraído por hidrodestilação, tem como constituinte mais abundante o eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol (88,38%) que apresenta várias atividades biológicas como, por exemplo, anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, antioxidante, antitumoral, inseticida, antibacteriana, entre outros. Tendo em vista a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o combate à resistência bacteriana e as diversas atividades biológicas apresentadas pelo óleo essencial do cravo-da-índia, o objetivo deste trabalho é extrair o óleo essencial dos botões florais desta planta e verificar sua atividade antimicrobiana perante as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para a extração do óleo essencial do cravo-da-índia utilizou-se o sistema extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL. Para a extração utilizou-se 200 gramas do botão floral do cravo e 500 mL de água destilada, realizando-se 2 repetições. Após separação do óleo por decantação, este foi submetido à centrifugação para a retirada do excesso de água. A atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo e do eugenol foi realizada pelo método de difusão de disco (MDD). A solubilidade do óleo em etanol foi de 1:2, o índice de refração foi de 1,5348. A aparência e o odor apresentados pelo óleo analisado foram considerados típicos. Obteve-se 7,29 gramas de óleo a partir de 200 gramas de botões florais, fornecendo um rendimento de 3,64 %. Através do teste de antibiograma constatou-se que o óleo e o eugenol apresentaram atividade na concentração de 20 µL contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, visto que o halo de inibição foi de 14 mm para ambas as bactérias. A atividade antibacteriana do óleo essencial foi atribuída de acordo com o halo de inibição, seguindo a classificação dos padrões de sensibilidade. Os resultados obtidos mostram que as duas bactérias testadas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* se mostraram sensíveis frente à concentração empregada do óleo essencial extraído e do eugenol, pois os halos formados foram superiores a 8 mm. Apesar de não ter sido feita a caracterização via RMN ¹H e IV, a identificação do óleo essencial extraído foi feita através dos parâmetros físico-químicos obtidos, os quais estão de acordo com os descritos na literatura.

Palavras-chave: cravo-da-índia; óleo essencial; antibiograma.

ABSTRACT

It's been a long time already; plant-based products such as extracts and essential oils have been used in various applications in mainstream medical studies. The essential India flower of clove buttons oil (*Syzygium aromaticum*), extracted by hydrodistillation, has as its most abundant constituent eugenol or 4-allyl-2-methoxyphenol (88.38%) that has various biological activities such as anti-inflammatory, healing, analgesic, antioxidant, antitumor, insecticide, antibacterial, among others. Given the need for new therapies for combating bacterial resistance and the various biological activities presented by the essential India clove oil, the aim of this study is to extract the essential oil from the flower buds such plant and check its antimicrobial activity before the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. For the extraction of the essential oil of clove used the Clevenger extractor system attached to a round bottom flask of 1000 ml. For the extraction we used 200 grams of floral bud stud and 500 ml of distilled water, performing two replications. After separation of the oil by decantation, this was subjected to centrifugation to remove the excess water. The antibacterial activity of the essential oil of Clove and Eugenol was performed by disk diffusion method (MDD). The solubility of the oil in ethanol was 1: 2, the refractive index was 1.5348. The appearance and odor provided by the oil analysis were considered typical. There was obtained 7.29 g oil from 200 grams of flower buds, providing a yield of 3.64%. Through the antibiogram test conducted it was observed that the oil and eugenol showed activity at a concentration of 20 uL against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, whereas the inhibition zone was 14 mm for both bacteria. The antibacterial activity of the essential oil was assigned according to inhibition zone following the classification of patterns of sensitivity. The results obtained show that the two tested bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were sensitive against the applied concentration of the essential oil extracted and eugenol as those formed halos were greater than 8 mm. Despite not having been the characterization via NMR 1H and IV, the essential oil extracted identification was made through the physical and chemical parameters obtained, which are consistent with those described in the literature.

Keywords: India Clove Flower; essential oil; antibiogram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Cravo-da-índia.....	20
Figura 2 -	A) Árvore, B) folha, C) frutos, D) botões florais secos do cravo-da-índia.....	21
Figura 3 -	Estrutura dos componentes do óleo essencial do cravo-da-índia (<i>S. aromaticum</i>) e a classe a que pertencem.....	25
Figura 4 -	Estrutura do α -Copaeno e do β -Copaeno.....	26
Figura 5 -	Extração por arraste a vapor.....	28
Figura 6 -	Sistema de Hidrodestilação.....	29
Figura 7 -	Hidrodestilação em Aparelho Clevenger.....	30
Figura 8 -	Aparelho de Soxhlet para extração de óleo com solvente.....	32
Figura 9 -	Etapas do processo de Enfleurage.....	33
Figura 10 -	Processo de extração por prensagem.....	34
Figura 11 -	Colônia <i>S. aureus</i> apresenta coloração preta em meio telurito-glicina.....	44
Figura 12 -	Micrografia de <i>Escherichia coli</i>	47
Figura 13 -	Ciclo de transmissão da <i>Escherichia coli</i>	49
Figura 14 -	Estrutura do eugenol e do acetato de eugenila.....	54
Figura 15 -	Sistema extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL.....	58
Figura 16 -	Crescimento da bactéria <i>E. coli</i> em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo eugenol (esquerda) e óleo (direita).....	63
Figura 17 -	Crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo eugenol (esquerda) e	

óleo (direita)..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem dos constituintes do óleo essencial de <i>S. aromaticum</i>	24
Tabela 2 -	Teor dos constituintes encontrados no óleo essencial de cravo.....	26
Tabela 3 -	Temperatura, Pressão e Densidade críticas de solventes utilizadas na EFS.....	36
Tabela 4 -	Resultados da incubação das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> após 24 horas.....	62
Tabela 5 -	Classificação dos padrões de sensibilidade de diferentes óleos essenciais.....	65
Tabela 6 -	Parâmetros físico-químicos do óleo essencial do cravo da Índia.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPbio	Nanopartículas de prata produzidos por <i>Fusarium oxysporium</i>
BHI	Brain Heart Infusion
CEPECI	Centro de Pesquisas em Ciências
CG – EM	Cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa
CG – FID	Cromatografia gasosa equipado a detector por ionização em chama
CH	Colite hemorrágica
CO ₂	Gás Carbônico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EFS	Extração por fluído supercrítico
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
BEM	Eosina azul de metileno
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênicas
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigenica
FEMA	Fundação Educacional do Município de Assis
GBS	Streptococcus do Grupo B
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IV	Infravermelho
LT	Termo lábil
MDD	Método de difusão de disco
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina

Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OE	Óleo essencial
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
<i>S. aromaticum</i>	<i>Syzygium aromaticum</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
ST	Termo sensível
TSB	Trypticase soy broth

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	CRAVO-DA-ÍNDIA.....	20
3.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA.....	23
4.	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	27
4.1	DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR.....	27
4.2	HIDRODESTILAÇÃO.....	28
4.3	EXTRAÇÃO POR SOLVENTE.....	30
4.4	ENFLEURAGE (ENFLORAÇÃO).....	32
4.5	PRENSAGEM.....	34
4.6	EXTRAÇÃO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO.....	35
5.	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	37
5.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
5.1.1	Atividade antibacteriana.....	38
5.1.2	Atividade antifúngica.....	39
5.2	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	39
5.3	ATIVIDADE INSETICIDA.....	40
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	40
5.5	EFEITO AFRODISÍACO.....	41
5.6	TOXICIDADE.....	41
6.	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	43

7.	<i>Escherichia coli</i>	47
7.1	<i>E. coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)	49
7.2	<i>E. coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)	50
7.3	<i>E. coli</i> ENTEROINVASORA (EIEC)	51
7.4	<i>E. coli</i> ENTEROPATOGÊNICAS (EPEC)	51
7.5	<i>E. coli</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	51
8.	ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA: UMA ALTERNATIVA PARA O ENSINO DE QUÍMICA ORGÂNICA	53
8.1	MATERIAIS E REAGENTES.....	55
8.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	55
9.	MATERIAIS E MÉTODOS	56
9.1	MATERIAIS.....	56
9.1.1	Equipamentos	56
9.1.2	Reagentes	57
9.1.3	Micro-organismos	57
9.1.4	Amostra	57
9.2	MÉTODOS.....	57
9.2.1	Extração do óleo essencial do cravo-da-índia	57
9.2.2	Preparo do inóculo	59
9.2.3	Preparo dos meios de cultivo	59
9.2.4	Plaqueamento	59
9.2.4.1	Superfície.....	59
9.2.5	Antibiograma	60

9.2.6	Características Físico-Químicas do óleo essencial.....	60
9.2.6.1	Solubilidade em etanol a 90% v/v.....	60
9.2.6.2	Índice de refração.....	60
9.2.6.3	Aparência.....	61
10.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
11.	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Há milhões de anos as plantas são utilizadas pelos homens que perceberam e continuam a descobrir a importância que as plantas medicinais possuem para o bem estar humano. Esta interação se traduz na religiosidade, modo de vida, trabalho, no trato com a saúde, conforme a compreensão dos grupos culturais que, desde antigamente até os dias atuais, praticam alguns dos conhecimentos repassados através das gerações. Plantas medicinais são plantas que possuem alguma substância em seu corpo que possui atividade biológica, estando seu uso associado à medicina popular (VICTÓRIO; LAGE, 2008; ASCENÇÃO; FILHO, 2013; MARTINS et al., 2010).

Há muito tempo os produtos de origem vegetal como os extratos e os óleos essenciais têm sido empregados em diversas aplicações na medicina popular (MARTINS et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2007).

De acordo com Simões e colaboradores (2007 *apud* AFFONSO et al., 2012, p. 149), “os óleos essenciais, óleos etéreos ou essências, podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com características odoríferas, sabor acre (ácido) e consistência oleosa”. Podem ser extraídos de várias partes da planta, tais como flores, folhas, cascas, frutos, sementes, raízes e rizomas (MORAIS et al., 2006; BIZZO; HOVELL; REZENDO, 2009).

Estes óleos são constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, normalmente, sendo estes metabólitos os responsáveis por suas propriedades organolépticas (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; BIZZO; HOVELL; REZENDO, 2009).

O óleo essencial dos botões florais do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), extraído por hidrodestilação, tem como constituinte mais abundante o eugenol ou 4-alil-2-metoxifenol (88,38%) e acetato de eugenila (10,98%). Pode apresentar coloração levemente amarelada ou até incolor, porém quando recém

extraído podem exibir baixa estabilidade na presença de luz, ar, calor e umidade (AFFONSO et al., 2012).

Estudos demonstram que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% apresentam atividade antibacteriana (LIMA et al., 2006).

O óleo essencial do cravo-da-índia apresenta várias atividades biológicas como, por exemplo, anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico, antitumoral, inseticida, antioxidante, antibacteriana, entre outros (SILVESTRI et al., 2010; AFONSO et al., 2012).

O uso indiscriminado e prolongado de antibióticos sintéticos tem provocado um aumento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas. Uma das alternativas para reverter esse problema é o emprego de produtos de origem natural (BERTINI et al., 2005; FERRONATTO et al., 2007).

Tendo em vista a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o combate à resistência bacteriana e as diversas atividades biológicas apresentadas pelo óleo essencial do cravo-da-índia, o objetivo deste trabalho é extrair o óleo essencial dos botões florais desta planta e verificar sua atividade antimicrobiana perante as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

2. CRAVO-DA-ÍNDIA

De acordo com Affonso e colaboradores (2012), “o nome cravo em português, deriva da palavra latina *clavus*, que significa “prego”, devido a sua aparência física (figura 1). Pertence a família das mirtáceas (*Myrtaceae*) e o seu nome científico é atualmente *Syzygium aromaticum*. Entretanto, já teve nomes científicos como *Eugenia caryophyllus* (Sprengel) Büllock et Harrison, *Caryophyllus aromaticus* L. *Eugenia caryophyllata* Tumb e *Eugenia aromatica* (L) Baill. Sua árvore é nativa das Ilhas Molucas, arquipélago situado na Indonésia, sendo disseminada pelos britânicos durante a colonização (AFFONSO et al., 2012; SILVESTRI et al., 2010).



Figura 1 – Cravo-da-índia (In: AFFONSO et al., 2012, p. 147).

O cravo tem sido usado desde a antiguidade, há cerca de dois mil anos atrás, pelos chineses como condimento, medicamentos e elementos básicos para a elaboração de perfumes e como incenso. Há relatos de que os chineses usavam o cravo para mascarar o hálito antes de falar com o imperador. Os egípcios também utilizavam o cravo como tônico para fortificar e fortalecer os homens que trabalhavam nas pirâmides (RABÊLO, 2010; AFFONSO et al., 2012; AFFONSO et al., 2014).

De acordo com Rabêlo (2010, p. 24), o cravo é uma árvore de grande porte (figura 2), podendo atingir de 12 a 15 metros de altura e o seu ciclo vegetativo chega a mais de cem anos. Sua copa é bem verde, tendo forma piramidal. As folhas são semelhantes as do louro, de cor verde brilhante, e contra a luz são visíveis glândulas oleosas. As flores são pequenas, branco-amareladas e agrupadas em cachos terminais. Já os seus frutos são do tipo baga, avermelhados e comestíveis. Possui aroma forte e o cravo frequentemente utilizado na culinária e na terapêutica é o botão floral seco do *S. aromaticum*.



Figura 2 – A) Árvore, B) folha, C) frutos, D) botões florais secos do cravo-da-índia. (In: AFFONSO et al., 2012, p. 148).

Atualmente Zanzibar e Madagascar são os maiores produtores de cravo no mundo, seguido pela Indonésia. Hoje no Brasil, o estado que mais produz cravo da Índia é a Bahia, na região de Valença, Taperoá e Ituberá, o que torna o país autossuficiente neste óleo (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; MAZZAFERA, 2003).

O cravo da Índia tem sido utilizado popularmente no tratamento de várias doenças, apesar de ainda subestimado pela suas propriedades terapêuticas. Contudo, alguns destes usos têm sido comprovados cientificamente, com revisões de literatura abordando suas propriedades terapêuticas. Seu emprego mais recente é uma formulação caseira, baseada na extração dos botões florais secos de *S. aromaticum* com etanol, a qual se mostrou eficiente como repelente contra mosquitos (AFFONSO et al., 2012; AFFONSO et al., 2014).

O óleo essencial puro, ou produtos derivados dele, cujo emprego principal é na odontologia, como anestésico e, o próprio botão floral seco utilizado como tempero, são os principais produtos derivados do cravo-da-índia que estão disponíveis no mercado nacional (AFFONSO et al., 2012).

3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA

Os óleos essenciais quando recém extraídos, de forma geral, são incolores ou levemente amarelados, não sendo muito estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais. Apresentam atividade óptica e índice de refração, tendo como característica principal a volatilidade e a pouca solubilidade em água. Apesar de serem normalmente misturas de centenas de compostos orgânicos, na maioria das vezes os óleos essenciais possuem um composto majoritário (GODINHO, 2012, AFFONSO et al., 2012; MAIA; DONATO; FRAGA, 2015).

Os óleos essenciais são formados por centenas de substâncias químicas. Seus constituintes variam, podendo ser hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples ou terpênicos, aldeídos, cetonas e fenóis. Entretanto, os terpenóides e os compostos aromáticos derivados do fenilpropano são os constituintes quase exclusivos dos óleos essenciais, estando os terpenóides presentes em maior concentração. Os terpenóides mais comumente encontrados nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos (GODINHO, 2012; CRAVEIRO, QUEIROZ, 1993).

Em decorrência da volatilidade dos constituintes do óleo essencial, a principal técnica de análise para a quantificação dos mesmos é a cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID). Já para a identificação dos constituintes presentes no óleo é empregada a cromatografia gasosa com detector de massas (AFFONSO et al., 2012).

Oliveira e colaboradores (2009) identificaram os constituintes do óleo essencial do *S. aromaticum* por cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa (CG-EM) e quantificaram por cromatografia gasosa equipado a detector de ionização em chama (CG-FID). Este estudo foi realizado com o óleo extraído dos botões florais, das folhas verdes, das folhas secas em estufa, pedúnculos e folhas secas ao sol, para verificar a proporção de cada constituinte do óleo de acordo com a porção vegetal. Os resultados desta identificação e quantificação estão apresentados na tabela 1.

Componente	Teor (%)				
	FV*	FSS*	FSE*	Pen*	BFS*
Eugenol	82,47%	87,07%	82,64%	90,41%	88,38%
β -cariofileno	10,78%	8,29%	10,45%	3,61%	0,64%
α -humuleno	1,44%	1,08%	1,63%	0,60%	-
Acetato de Eugenila	1,89%	-	-	3,76%	10,98%
Óxido de cariofileno	0,47%	-	0,51	-	-

*FV – folhas verdes; FSS – folhas secas ao sol; FSE – folhas secas em estufa; Pen- pedúnculo; BFS – botões florais secos

Tabela 1 – Porcentagem dos constituintes do óleo essencial de *S. aromaticum* (In: OLIVEIRA et al., 2009, p. 774).

É possível observar que as porcentagens variam de acordo com a porção do vegetal analisada e que nos botões florais o eugenol e o acetato de eugenila são os principais componentes.

Na figura 3 estão apresentadas as estruturas dos constituintes do óleo essencial do cravo-da-índia.

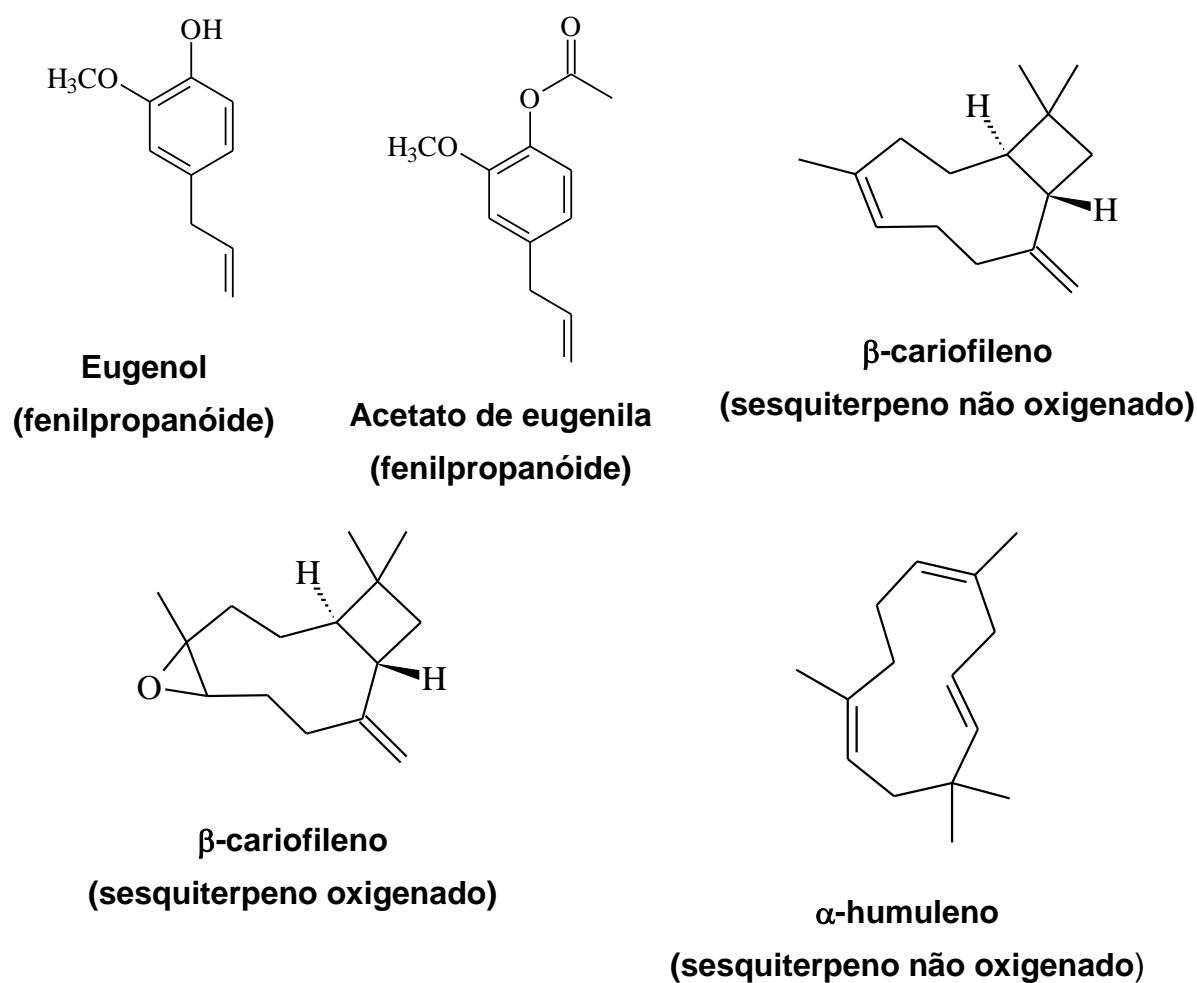


Figura 3 – Estrutura dos componentes do óleo essencial do cravo-da-índia (*S. aromaticum*) e a classe a que pertencem (In: AFFONSO et al., 2012, p. 150; AFFONSO et al., 2014, p. 1319).

No estudo realizado por Rabêlo (2010), a quantificação e identificação dos constituintes do óleo essencial do cravo foram feitas por análise de cromatográfica gasosa acoplado a espectro de massa (CG-EM). Cada componente e sua respectiva porcentagem está apresentada na tabela a seguir:

Componente	%
Eugenol	52,53
Copaeno	2,05
Cariofileno	37,25
Humuleno	4,11
Acetato de eugenila	4,05

Tabela 2 – Teor dos constituintes encontrados no óleo essencial de cravo (In: RABÊLO, 2010, p. 52).

Na figura 4 estão apresentadas as estruturas do α -Copaeno e β -Copaeno.

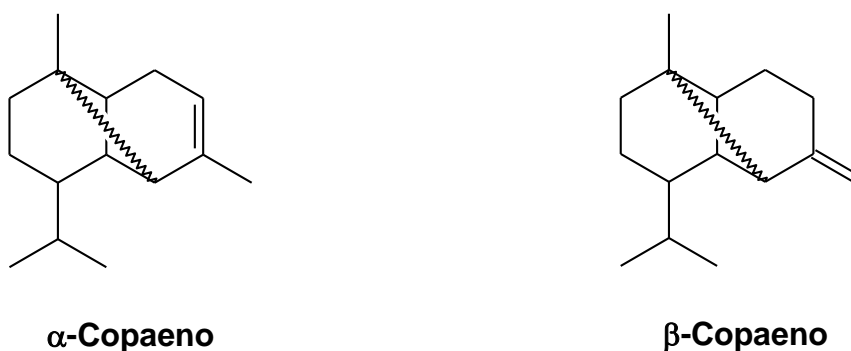


Figura 4 - Estrutura do α -Copaeno e do β -Copaeno (In: BARROS; ZAMBARBA; HEINZMANN, 2009, p. 865).

Affonso e colaboradores (2012), mostraram que vários autores também quantificaram por CG-FID os compostos do óleo essencial do cravo da Índia e todos apontaram como constituintes majoritários o eugenol, o β -cariofileno e o acetato de eugenila. Outros componentes aparecem em menor proporção tais como: α -humuleno, calacoreno e calameneno.

4. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Uma mesma planta dependendo da época do plantio, fatores climáticos, tipo de solo e ciclo vegetativo pode variar a composição química do óleo essencial extraído. O método escolhido para extração de determinado óleo essencial (OE) depende da região da planta, bem como para que finalidade o mesmo será usado (RABÊLO, 2010).

Há vários métodos para extrair OE como: destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO₂ supercrítico, expressão a frio, maceração, ultrassom, enfloração (enfleurage), estando esta última em desuso (MARTINS, 2010; NEUWIRTH; CHAVES, 2008).

4.1 DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR

A destilação por arraste a vapor (figura 5) é um dos processos mais utilizados no Brasil a nível industrial, e por ser simples e de baixo custo se destaca dos outros métodos (FERNANDES et al., 2013; SILVEIRA et al., 2012).

Neste processo o material a ser extraído é colocado em vasos extratores, moído, picado ou triturado, onde é submetido a uma corrente de vapor de água, extraindo assim os compostos aromáticos da planta. Os vapores passam pelo condensador, onde ocorre a condensação da água e do óleo essencial, sendo coletados em seguida em um recipiente. A separação dos dois líquidos pode ser feito por decantação. Neste método a amostra não entra em contato direto com a água em ebulição (MACHADO; JUNIOR, 2011; GOMES, 2003).

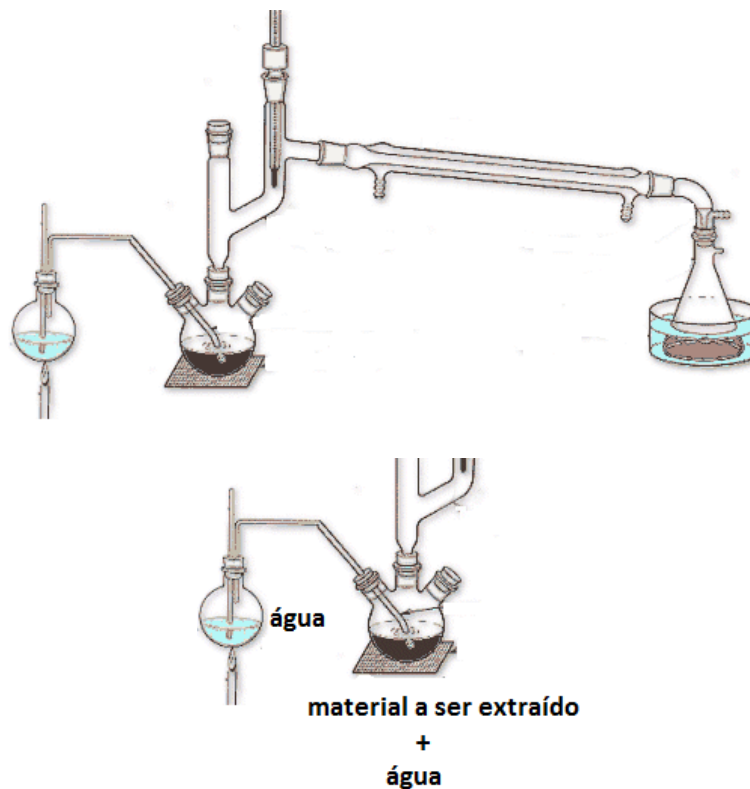


Figura 5 – Extração por arraste a vapor (In: <http://www.qmc.ufsc.br>, 2015).

De acordo com Gomes (2003), a extração por arraste a vapor é industrialmente viável, pois apresenta bons rendimentos, em torno de 0,5 a 4% e os produtos obtidos são de grande pureza. Entretanto, a desvantagem desta técnica é que durante o processo de destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar hidrólise dos ésteres, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações.

4.2 HIDRODESTILAÇÃO

Neste processo (figura 6) a matéria prima permanece em contato com a água fervente, podendo estar imersa ou flutuante. Com o aquecimento a água evapora e os vapores formados arrastam os compostos voláteis do óleo. Essa mistura de vapor e soluto pode ser chamada de hidrolato, a qual ao passar pelo condensador forma uma mistura heterogênea de água e óleo (GOMES, 2003; ORLANDA, 2011).

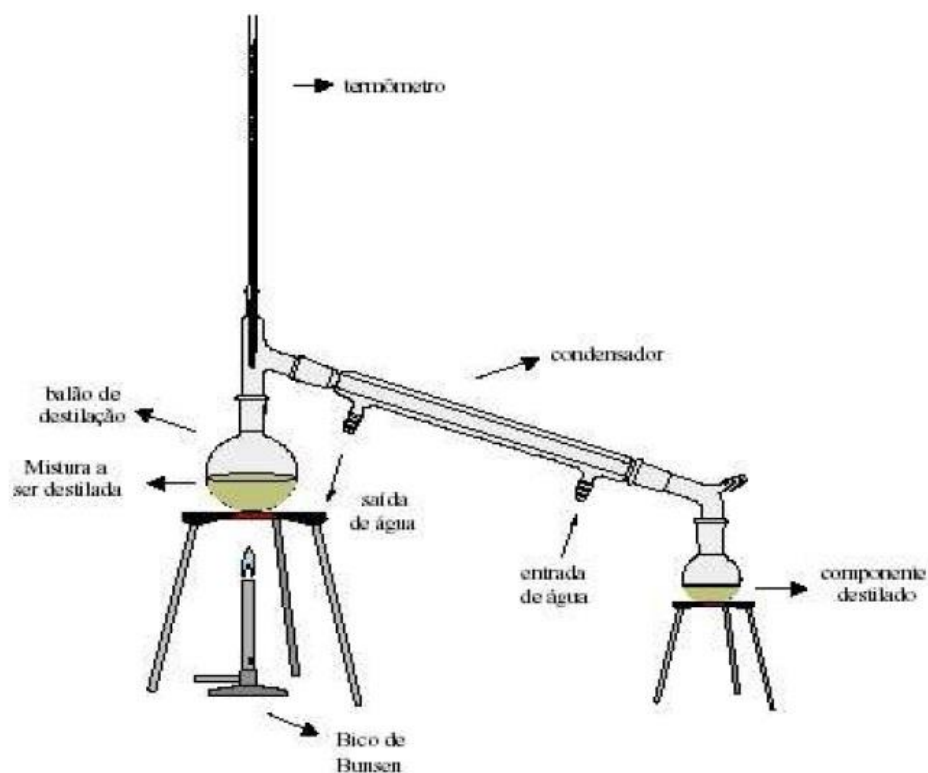


Figura 6 – Sistema de Hidrodestilação (In: FERNANDES, 2012, p. 26).

Quando os óleos são usados em escala industrial o método mais utilizado para sua extração é o aparelho de Clevenger (figura 7), o qual apresenta vantagens em relação a destilação convencional, por ser mais compacto e fornecer melhores determinações de teores de óleos (RODRIGUES, 2002).

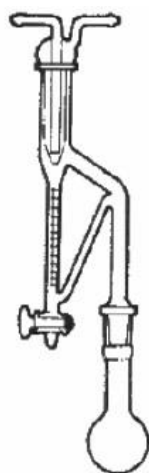


Figura 7 – Hidroddestilação em Aparelho Cleveger (In: SILVEIRA et al., 2012, p. 2044).

O óleo obtido pela destilação é uma mistura de componentes orgânicos imiscíveis em água, quando coletado naturalmente o óleo se separa da água, formando duas fases. Posteriormente, após a separação das fases, esse líquido é seco com Na_2SO_4 anidro e está pronto para seu devido uso (RODRIGUES, 2002).

4.3 EXTRAÇÃO POR SOLVENTE

Esta técnica é empregada porque algumas plantas não suportam o aumento de temperatura, por isso é usada a extração por solventes, de preferência, solventes orgânicos. Para esta extração é necessário que se conheça a polaridade da substância a ser extraída, para que se possa determinar o solvente ou a mistura de solventes usada para determinada extração (FERNANDES, 2012; SIMÕES et al., 2000).

Na extração por solventes muitas vezes acaba extraído-se outros compostos além do óleo essencial como compostos lipofílicos, por isso, raramente possuem valor comercial (SILVA, 2006). Alguns dos solventes mais usados na extração de óleo essencial são: tolueno, diclorometano e clorofórmio (SIMÕES et al., 2000).

Esta técnica consiste em colocar a matéria prima em contato com um solvente previamente selecionado. As plantas são imersas neste solvente e após certo tempo, suficiente para que os constituintes solúveis da planta sejam transferidos, efetua-se a separação sólido e líquido. Na fase final o óleo é obtido pela evaporação do solvente da fase líquida. Este método, porém, apresenta algumas desvantagens como resíduos do solvente presente no óleo. Este resíduo pode causar alterações químicas nas moléculas e assim causar efeitos tóxicos nos consumidores. Para a remoção de todo o solvente é necessário equipamentos de alto custo (OLIVEIRA; JOSÉ, 2007; SILVEIRA et al., 2012).

Os resíduos de solventes nos óleos essenciais variam de menos de 1% até 6%, o que influencia na composição química do óleo. No caso do óleo essencial de cravo, quando extraído por hidrodestilação apresenta de 70-90% de eugenol, 5-12% de β -cariofileno. Este último geralmente não é encontrado quando extraído com solventes (OLIVEIRA; JOSÉ, 2007).

Na figura 8 está apresentado um aparelho de Soxhlet, o qual pode ser empregado para extração por solvente.



Figura 8 – Aparelho de Soxhlet para extração de óleo com solvente (In: LOREGIAN, 2013, p. 21).

4.4 ENFLEURAGEM (ENFLORAÇÃO)

De acordo com Damini (2003), a enfleurage apesar de ser uma técnica em desuso atualmente, já foi muito utilizada. Atualmente só é utilizada em algumas indústrias do ramo da perfumaria. Este método consiste em extrair óleos de plantas com baixo teor de óleo, porém com alto valor comercial como no caso das flores. O solvente usado nessa extração é uma gordura de origem vegetal ou animal (SILVA, 2006).

As pétalas são colocadas sobre a camada de gordura, à temperatura ambiente durante um determinado tempo. Após as pétalas terem se esgotado totalmente são trocadas por pétalas novas até que se obtenha a quantidade desejada. A gordura é tratada com álcool, para a obtenção do óleo essencial. O álcool é destilado a baixas

temperaturas e por fim o produto obtido possui alto valor comercial (RABÊLO, 2010; OLIVEIRA; JOSÉ, 2007). A figura 9 mostra as etapas do processo de extração por enfleurage.



Figura 9 – Etapas do processo de Enfleurage (In: <http://www.pausaparafeminices.com>, 2015).

4.5 PRENSAGEM

De acordo com Damini (2003) este método é mais utilizado para extrair óleo de frutas cítricas como laranja, limão e bergamota. No processo de prensagem (figura 10) é usada a casca ou as sementes dos frutos. A prensagem feita na máquina, fornece um óleo de composição quase idêntica ao óleo obtido por prensagem manual (SHREVE; BRINK Jr, 1997).

As cascas ou as sementes são prensadas e é extraído o óleo em conjunto com o suco da mesma. Após esta etapa esse suco é separado do óleo através de centrifugação, decantação ou destilação fracionada, sendo o óleo obtido de grande qualidade (OLIVEIRA; JOSÉ, 2007).



Figura 10 – Processo de extração por prensagem (In: SILVEIRA et al., 2012, p. 2049).

4.6 EXTRAÇÃO POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO

A extração por fluido supercrítico (EFS) vem se destacando em diversos ramos da indústria, tais como, químicas, petroquímicas, farmacêuticas, alimentícia, entre outras (OLIVEIRA; JOSÉ, 2007).

Neste processo de extração, primeiramente o CO₂ é liquefeito, sendo em seguida aquecido a uma temperatura acima de 31 °C, chamada de temperatura crítica. É nela que o CO₂ atinge o estado em que sua viscosidade é parecida com um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Após a extração ser realizada, a pressão é diminuída e o CO₂ retorna a seu estado gasoso, não deixando nenhum vestígio de solvente (DAMINI, 2003; OLIVEIRA; JOSÉ, 2007; RABÊLO, 2010).

Nenhum traço do solvente permanece no óleo obtido, portanto o produto obtido é mais puro do que os óleos essenciais obtidos por outros métodos. Neste método solvente extrator é aquecido acima da sua temperatura e pressão críticas (tabela 3). Quando a substância atinge este estado ela possui propriedades intermediárias entre os estados líquido e gasoso, o que faz com que seja vantajoso o seu uso para extração e purificação de substâncias (SILVA, 2006; RODRIGUES, 2002).

Solvente	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (atm)	Densidade crítica (g cm ⁻³)
Dióxido de carbono	31,1	72,85	0,469
Óxido nitroso	36,5	71,5	0,452
Amônia	133	111,54	0,236
Água	374	217,17	0,323
Etano	32	48,17	0,203
Propano	97	41,85	0,217
Etileno	9	49,65	0,218
Benzeno	289	48,27	0,302
Tolueno	319	40,57	0,292
Metanol	240	79,86	0,272
Etanol	241	60,61	0,276
Acetona	235	46,39	0,279
Éter etílico	194	35,93	0,265
Piridina	347	55,57	0,312

Tabela 3 – Temperatura, Pressão e Densidade críticas de solventes utilizadas na EFS (In: RODRIGUES, 2002, p. 43).

A EFS apresenta vantagens em relação a outros métodos utilizados, como utilização de baixas temperaturas, o que permite a extração de produtos termosensíveis, uso de solventes atóxicos e de baixo custo, redução do tempo de extração, eliminação fácil do solvente após extração, entre outros (OLIVEIRA; JOSÉ, 2007; SILVEIRA et al., 2012; RODRIGUES, 2002).

5. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Usados na aromaterapia, os óleos essenciais por serem voláteis e apresentarem vantagens em relação a outros medicamentos, são comumente usados em nebulizações, banhos de imersão e inalações. São utilizados desde a antiguidade, por suas importantes propriedades biológicas como atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante (MACHADO; JUNIOR, 2011; SOUZA et al., 2010).

Não só o óleo essencial do cravo apresenta propriedades, como também o próprio botão floral que ao ser mastigado higieniza a boca e elimina o mal hálito. Os chás também apresentam ações contra náuseas, indigestões, gripes, rouquidões e tosses (MANON, 2002).

O eugenol além de ser o componente majoritário não só do óleo essencial do cravo, mas também o de outras especiarias é o responsável por inúmeras das atividades biológicas atribuídas ao cravo. O efeito depende da concentração de eugenol livre e do tempo que ele fica exposto ao tecido (AFFONSO et al., 2012; SOUZA, 2007).

Alguns efeitos atribuídos ao óleo essencial do cravo são: atividade antifúngica (ASCENÇÃO; FILHO, 2013); antibactericida (RABÊLO, 2010); antioxidante (SILVESTRI et al., 2010); nematocida (SANTOS et al., 2007); efeito alelopático (MAZZAFERA, 2003). Outras atividades podem ser destacadas como: antiviral, antiúlcera, antidiabético, afrodisia, antitumoral, anestésico e anti-inflamatório, inseticida, modulador de respostas imunes, anticarcinogênica, cardiovasculares, antinociceptiva e anestésica local (AFFONSO et al., 2012; LINARD 2008).

O eugenol é muito usado como anestésico na área odontológica, pelas suas propriedades seladoras e também como antissépticos de higiene bucal. Também já foi comprovado o efeito anestésico geral, hipnótico e antidepressor, que foi verificado em ratos (RABÊLO, 2010; SOUZA, 2009).

5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Dentro da atividade antimicrobiana podemos destacar duas atividades: atividade antibactericida e antifúngica (AFFONSO et al., 2012).

5.1.1 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do cravo tem sido atribuída à estrutura fenólica do eugenol que em concentrações elevadas degrada as proteínas das membranas celulares das bactérias, resultando no dano da membrana celular, o que causa a morte da bactéria. O eugenol também apresenta eficácia no tratamento de enfermidades causadas por micro-organismos patogênicos (LINARD, 2008; ESCOBAR, 2002).

O óleo apresenta acentuada atividade antimicrobiana, quando testado para os micro-organismos tanto Gram-positivos como Gram negativos tais como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (SCHERER et al 2009), *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus epidermidis* (AFFONSO et al., 2012; LIMA, 2009).

De acordo com Biasi-Garbin e colaboradores (2015) o potencial sinérgico do eugenol com nanopartículas de prata produzidas por *Fusarium oxysporum* (AgNPbio), apresentou atividade contra *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B (GBS)), que é um agente infeccioso que causa doenças em recém-nascidos. As doenças causadas nos recém-nascidos podem ser pneumonia, septicemia ou meningite. Essas doenças estão associadas à colonização do trato vaginal de mulheres grávidas.

5.1.2 Atividade antifúngica

De acordo com Affonso e colaboradores (2012) os óleos essenciais são constituídos por substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, o que facilita sua penetração eficiente na membrana celular. Estudos já mostraram que os óleos essenciais penetram 100 vezes mais rápido que a água o que lhe confere a atividade antifúngica.

O óleo essencial de cravo tem atividade comprovada contra os fungos: *Penicillium crustosum*, *Alternaria alternata* e *Aspergillus flavus* (VANIN, 2014), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Passiflorae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (ASCENÇÃO; FILHO, 2013).

5.2 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Antinociceptismo é a capacidade que o eugenol tem de anular ou amenizar os estímulos que causam dor (LINARD, 2008). Segundo Souza (2007), dados obtidos, indicam que o eugenol quando administrado oralmente apresenta significativa atividade no teste das contorções abdominais, teste da placa quente e teste da formalina.

Daniel e colaboradores (2009), também provaram a eficácia do eugenol quando doses de 50, 75 e 100 mg/kg foram administradas em camundongos, apresentando efeito antinociceptivo significativo no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em comparação com o grupo controle. Entretanto, o eugenol apresentou atividade apenas nos estímulos químicos e não nos estímulos térmicos, o que sugere que o eugenol inibi predominantemente o mecanismo da dor periférica.

5.3 ATIVIDADE INSETICIDA

Cada vez mais a Dengue tem tomado maior proporção, sendo depois da malária a doença de maior relevância no Brasil transmitida por mosquito. Secretarias de saúde vêm incentivando o uso de repelente caseiro a partir do cravo-da-índia e é através de seu extrato alcóolico que são preparados os repelentes (AFFONSO et al., 2014).

A vantagem do uso de repelentes naturais é a degradação e ação rápida, seletividade, custo, toxicidade de baixa a moderada e baixa fitotoxicidade. Segundo autores o eugenol apresenta atividades contra vários mosquitos, tais como, *Cosmopolites sordidus* Germar, *Pediculus capitis*, *Culex pipiens*, *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais*, *Dermatophagoides farinae*, *D. Pteronyssinus*, *Psoroptes Cuniculi* e cupins japoneses (AFFONSO et al., 2012).

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

De acordo com Sichieri (2013), a procura por antioxidantes naturais vem sendo intensificada durante as últimas décadas, objetivando a substituição dos antioxidantes sintéticos, já que estes causam efeitos negativos à saúde humana.

O efeito antioxidante das plantas se dá aos compostos fenólicos presentes nelas. O consumo desses compostos inibe a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas (MORAIS et al., 2009).

Morais e colaboradores (2009), realizaram estudos com chás e condimentos de grande consumo no Brasil. Os testes foram realizados pelo método sequestrador de radicais livres DPPH. De acordo com os resultados, o cravo obteve bom desempenho antioxidante, pois tem em sua composição o eugenol, um composto fenólico que é um dos responsáveis pela inibição de radicais livres no organismo.

Silvestri e colaboradores (2010) também realizaram estudo da atividade antioxidante do óleo de cravo. A metodologia foi baseada na medida da extinção do radical DPPH em 515 nm. O experimento foi realizado em diferentes concentrações do óleo

(150; 250; 500; 1000; 2500; 5000; 7500; 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em etanol. Os resultados indicaram que o percentual antioxidante foi aumentando de acordo com a concentração do óleo.

5.5 EFEITO AFRODISÍACO

De acordo com Tajuddin; Latif; Qasmi, (2004) realizaram estudo com extrato etanólico do *S. aromaticum* a fim de provar efeito afrodisíaco em ratos albinos machos. As doses foram administradas oralmente e diariamente em diferentes doses do extrato, tendo como referência a sildenafil.

Os resultados obtidos mostraram que houve um aumento significativo da atividade sexual de ratos machos. Houve um aumento também na frequência de montagem e na frequência de intromissão. A administração do extrato nos ratos não causou ulcera gástrica e nenhum tipo de efeito tóxico, estresse ou mudanças de comportamento (TAJUDDIN; LATIF; QASMI, 2004).

5.6 TOXICIDADE

De acordo com Affonso e colaboradores (2012), toda substância pode ser considerada tóxica, entretanto, tem que se levar em consideração as condições de exposição, como por exemplo, a dose administrada ou absorvida, o tempo e frequência de exposição entre outras. Um estudo mostrou que o eugenol pode apresentar diferentes tipos de toxicidades, podendo causar ao organismo: dermatites, reações alérgicas, disfunção hepática, coagulação intravascular disseminada e hipoglicemia severa. Porém, em contato com a pele humana tanto o eugenol como o óleo essencial, apresentaram boa tolerabilidade e baixa alergenicidade quando adicionados em produtos de higiene pessoal. Na odontologia também apresenta baixa toxicidade (AFFONSO et al., 2012; LINARD 2008).

Vanin e colaboradores (2015) realizaram ensaios com micro crustáceo *Artemia salina*, expondo-os a diferentes concentrações de óleo e de éster (acetato de eugenila) (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL) e os resultados mostraram que conforme a concentração de óleo aumentava maior era a taxa de mortalidade. O éster apresentou maior toxicidade do que o óleo essencial, porém ambos foram considerados altamente tóxicos. Concluiu-se, portanto, que é necessário que se conheça tanto as propriedades biológicas como também seu potencial tóxico.

6. *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados e são anaeróbios facultativos. Essa bactéria apresenta-se agrupados em cachos irregularmente (*staphyle* em grego significa cacho de uvas), devido a sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (TRABULSI; ARTERTHUM, 2005; SANTOS et al., 2007; CRUZ, 2008).

S. aureus foi descoberto em 1880 pelo cirurgião Sir Alexander Ogston. É conhecida pela coloração amarela, quando cultivado em meios ricos em nutrientes. Por isso que recebeu o nome de *Staphylococcus aureus* (*aureus* em latim significa dourado) por Rosenbach, que isolou pela primeira vez uma colônia de *S. aureus* em 1884 (STARK, 2013).

Essa bactéria cresce em diversos meios, desde os mais comuns como caldo ou ágar simples, pH = 7, a temperatura ótima de 37°C. Apresenta crescimento também em ágar-sangue e ágar manitol-sal. Também cresce em meios com altas concentrações de NaCl (cloreto de sódio), sendo assim considerados halofílicos. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A cor das colônias formadas depende do meio utilizado (GODINHO, 2012; SANTOS et al., 2007; COSTA, 2008).

A figura 11 mostra o crescimento de colônias de *S. aureus* em meio telurito-glicina.



Figura 11 – Colônia *S. aureus* apresenta coloração preta em meio telurito-glicina (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, p. 155).

É encontrada como parte da microbiota normal da pele e mucosa de uma grande parte dos mamíferos. Este gênero compreende 33 espécies e dessas 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (TRABULSI; ARTERTHUM, 2005; RATTI; SOUSA, 2009). De acordo com Chapaval et al. (2009) de 30-50% da população humana é portadora natural desse micro-organismo.

De acordo com Leite (2008) o *S. aureus* apresenta como característica a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a agentes antimicrobianos. O uso extensivo de antibióticos resultou em um aumento na resistência de *S. aureus* em isolados clínicos.

As doenças provocadas vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras). O *S. aureus* é a principal bactéria causadora de doenças comunitárias e infecções hospitalares (TRABULSI; ARTERTHUM, 2005; CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011; SALES; SILVA, 2012).

A transmissão de pessoa para pessoa pode ocorrer por contato direto, sendo esta muito comum em ambientes hospitalares, pois os profissionais da área podem se contaminar prestando serviços aos pacientes portadores da bactéria, podendo assim, transmitir para outros pacientes (SALES; SILVA, 2012).

De acordo com Stark (2013), o *Staphylococcus aureus* pode se desenvolver de diferentes formas podem causar desde infecções simples até graves e potencialmente fatais, tais como pneumonia, endocardite, artrite séptica e septicemia. Além de causar infecções o *S aureus* pode causar também intoxicação alimentar, isso se deve ao fato de que esta bactéria cresce bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade. Essas intoxicações são determinadas por algumas toxinas que são produzidas pela bactéria (TRABULSI; ARTERTHUM, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011).

As cepas de *S. aureus* apresentam resistência à penicilina em maior proporção, chegando a 95%. Mais de 50% apresentam resistência à meticilina, uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por este organismo (LEITE, 2008).

A resistência à penicilina foi detectada logo após o início de seu uso na década de 40. Essa resistência se deve pela aquisição dos genes que codificavam as enzimas inicialmente conhecidas como penicilinasas, e agora chamadas β -lactamases. Em 1950, a produção de penicilinasas pelos *S. aureus* passou a predominar nas cepas isoladas de pacientes hospitalizados. Na década de 60 foi lançada a meticilina para o combate das cepas produtoras de penicilinasas, entretanto um ano após essa descoberta há relatos de cepas que apresentaram também resistência a meticilina e passaram a ser chamado então de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (ANVISA, 2007).

Estudo realizado em um hospital-escola da Califórnia demonstrou a presença de 87% de MRSA entre os *S. aureus* isolados de pacientes apresentando infecções dermatológicas atendidos no setor de emergência. Esse estudo defende a drenagem dos abscessos cutâneos como tratamento preferencial, em contrapartida ao uso de antimicrobianos (GELATTI et al., 2009).

De acordo com Sales & Silva (2012), nos últimos vinte anos a MRSA tem sido um dos grandes vilões das bactérias responsáveis por infecções nosocomiais. Essa

bactéria apresenta vários graus de infecção, uma vez que existe várias formas de contaminação como hospitalização prolongada, cirurgia, ficar em unidades de terapia intensiva, o uso irracional de antibióticos e a proximidade com a equipe médica ou outros pacientes colonizados, ou infectados e procedimentos invasivos. É válido ressaltar que este micro-organismo é capaz de permanecer viável em superfícies por semanas ou até meses.

7. *Escherichia coli*

Escherichia coli (figura 12) é um micro-organismo pertencente à família das *Enterobacteriaceae*. É classificada como bacilos Gram-negativo, não esporulado, em sua maioria móveis (possuem flagelos), anaeróbias facultativas e fermentadoras de açúcares (CULLER, 2010; KASNOWSHI, 2004). Essa espécie é tipicamente não patogênica e faz parte da microbiota normal de humanos e animais, sendo encontrada em maior quantidade no intestino grosso (cerca de 10^{12} bactérias) (SILVA; SILVA, 2005; AYALA, 2009).

De acordo com Alves (2012), a *E. coli* cresce em temperaturas de 8 a 48°C, entretanto, sua temperatura ótima é 37°C e seu pH ótimo é entre 6 e 8. Também cresce em meios com até 8% de NaCl (MARTINS, 2010).



Figura 12 – Micrografia de *Escherichia coli* (In: MARTINS, 2010, p. 41).

Em 1885 foi descrita pela primeira vez pelo médico alemão Theodore Escherich com o nome de *Bacillus coli comune*, que notou que ela prevalecia na microbiota

intestinal de indivíduos saudáveis e que causava doenças quando inoculadas em sítios extra-intestinais. Em 1919 seu nome mudou para *Escherichia coli* fazendo referência ao seu descobridor (BUERIS, 2008).

A *E. coli* é uma espécie universal, considerada o ser vivo mais conhecido na face da terra (*E. coli* K12), distinguindo-se em dois grandes grupos de amostras em relação com o ser humano. O primeiro grupo é chamado de *E. coli* comensal, que são bactérias que habitam o intestino humano desde o nascimento até a morte, sendo constituídas por amostras que causam infecções por mecanismos comuns e o segundo grupo é chamado de *E. coli* patogênica, que são as que causam uma gama de infecções (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; SAMEGINA, 2008).

A *E. coli* comensal apenas causa infecções em pessoas imunodeprimidas ou quando esta se encontra em situações não fisiológicas. As *E. coli* consideradas patogênicas são responsáveis por uma variedade de infecções entre elas a diarreia, disenteria, colite hemorrágica, infecções de bexiga e rim, pneumonia, entre outras (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; MARTINS, 2010).

A contaminação pode ocorrer principalmente por alimentos contaminados pelas fezes bovinas, outras formas de contaminação é a ingestão de alimentos como a carne, o leite e as saladas contaminadas com fezes de animais que são utilizadas como adubos e também por hábitos inadequados de higiene (figura 13) (FRANCO, 2002; KASNOWSHI, 2004).

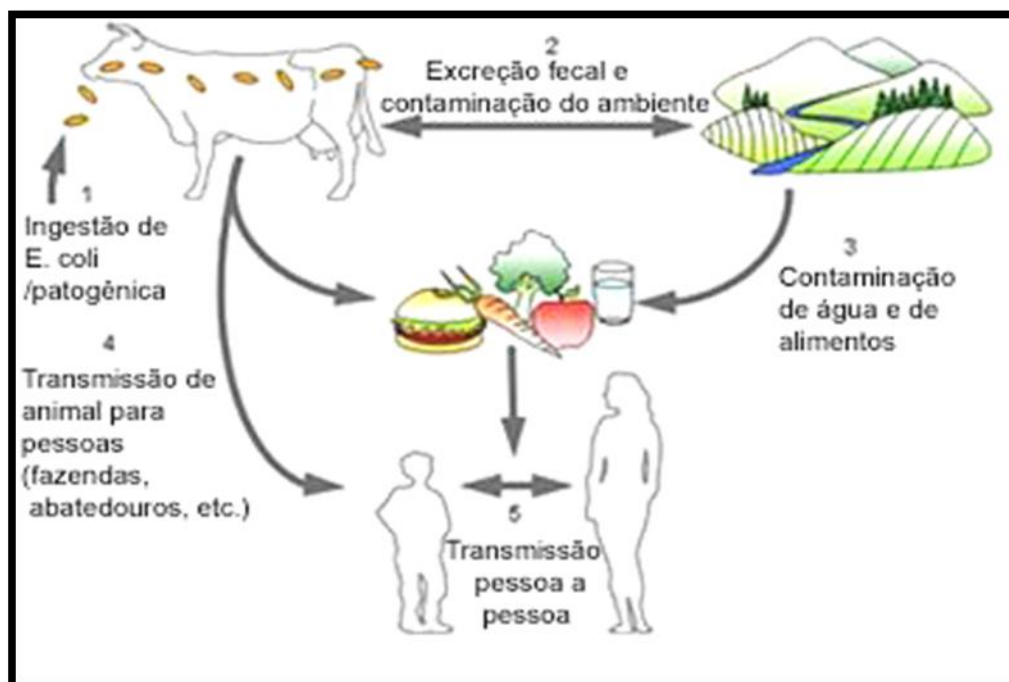


Figura 13 - Ciclo de transmissão da *Escherichia coli* (In: ALVES, 2012, p. 29).

Este gênero encontra-se largamente na natureza e integra o grupo das bactérias dos coliforme subdividindo-se em vários biótipos e sorotipos, alguns dos quais patogênicos em potencial para o homem. Esses sorotipos estão divididos de acordo com o seu fator de virulência e mecanismos pelos quais podem ocasionar a doença. São cinco divisões, sendo elas: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (WIEST et al., 2009; AYALA, 2009).

7.1 *E. coli* ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)

A *E. coli* enterohemorrágica se destaca dos outros grupos como sendo o mais importante em termos de infecções alimentares. A infecção pode ser adquirida de diversas formas como pela ingestão de alimentos mal cozidos, vegetais e frutas contaminados com fezes bovinas, leite não pasteurizado, entre outros. O seu sorotipo mais importante é a *E. coli* O155:H7 (MARTINS, 2010; GODINHO, 2012).

Este sorotipo foi identificado como agente etiológico causador de colite hemorrágica em 1983 quando houve um surto pela ingestão de hambúrgueres mal cozidos de uma rede de fast-food nos Estados Unidos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006).

O período de incubação dessa bactéria varia de três a nove dias, com média de quatro dias. A EHEC pode causar nos seres humanos colite hemorrágica (CH), síndrome hemolítica urêmica (SHU), púrpura trombocitopênica e infecções assintomáticas. A colite hemorrágica é caracterizada por severas dores abdominais e diarreia com presença de sangue, 10% das pessoas que tem CH acabam desenvolvendo SHU doença grave e muitas vezes fatal (FRANCO, 2002; AYALA, 2009; MITTELSTAEDT; CARVALHO, 2006).

7.2 *E. coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

De acordo com Rodrigues (2009), a ETEC é responsável pela causa de diarreia em crianças de 1 a 5 anos de idade em países desenvolvidos, sendo esta apontada como responsável pela mortalidade infantil, apresentando 380 mil óbitos anuais aproximadamente (MARTINS, 2010).

Essas bactérias são capazes de aderir a mucosa intestinal através das fímbrias e os sintomas apresentados pelas pessoas são: diarreia aquosa, febre baixa, dores abdominais, náuseas chegando a quadros fatais. O seu período de incubação é de 8 a 44 horas após a ingestão do alimento contaminado e duração média de 3 a 19 dias (CULLER, 2010; ALVES, 2012).

De acordo com Trabulsi & Alterthum (2005), a ETEC produzem enterotoxinas termo lábil (LT) e termo sensível (ST) que diferem com relação à sua tolerância a temperatura, imogenicidade e mecanismo de ação, entretanto, as que produzem as toxinas ST são as mais associadas aos casos endêmicos.

7.3 *E. coli* ENTEROINVASORA (EIEC)

A *E. coli* enteroinvasora interagem preferivelmente com as células do cólon causando diarreia aquosa, febre, arrepios, dores de cabeça, mialgia e cólicas abdominais. Também são capazes de invadir e penetrar nas células epiteliais podendo levar o indivíduo a morte, sua patogenicidade é semelhante à da bactéria *Shigella* (ALBUQUERQUE, 2006; KASNOWSHI, 2004; ALVES, 2012).

As infecções causadas por EIEC são frequentes em crianças maiores de dois anos e em adultos (MARTINS, 2010). Os sintomas começam a aparecer depois de 8 a 24 horas após o consumo do alimento contaminado e sua duração pode variar de dias até semanas (ALVES, 2012).

7.4 *E. coli* ENTEROPATOGÊNICAS (EPEC)

A EPEC estão associadas com diarreia em crianças recém nascidas em países em desenvolvimento, são capazes de aderir à superfície das células epiteliais do intestino delgado, provocando lesões ao nível das microvilosidades. Estas têm apresentado uma alta taxa de mortalidade entre 10-40% (AYALA, 2009; ALVES, 2012).

Os sintomas são diarreia aguda, febre, vômito e mal-estar. Os sintomas surgem entre 17-72 horas após a ingestão do alimento contaminado e normalmente duram 3 dias (ALVES, 2012; AYALA, 2009).

7.5 *E. coli* ENTEROAGREGATIVA (EAEC)

A EAEC é conhecida por desenvolver diarreias persistentes em crianças e adultos em países desenvolvidos, recentemente foi detectado a mesma bactéria em casos de diarreias prolongadas em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MARTINS, 2010; SAMEGIMA, 2008).

A *E. coli* enteroagregativa adere as células epiteliais denominado de adesão agregativa e não secreta enterotoxinas termolábeis e termoestáveis como as ETEC. Como possuem adesão agregativa formam biofilmes o que está relacionado a infecção persistente chegando a durar mais de 14 dias (CULLER, 2010).

8. ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA: UMA ALTERNATIVA PARA O ENSINO DE QUÍMICA ORGÂNICA

A matéria de Química é considerada pelos alunos como uma matéria complexa e de alta dificuldade. O ensino da química no ensino médio baseia-se apenas na teoria, ou seja, conceitos, regras, fórmulas e classificações. Diante disso percebe-se que os alunos não assimilam o conteúdo estudado com o seu cotidiano. Essa abordagem teórica faz com que eles apenas memorizem o conteúdo estudado (VEIGA; QUENENHEMM; CARGENIN, 2013; RIBEIRO, 2014).

No ensino de ciências a experimentação pode ser uma estratégia eficaz, fazendo com que desperte um forte interesse dos alunos pela matéria. Com base nos depoimentos dos alunos, a experimentação tem um caráter motivador, lúdico e essencialmente vinculados aos sentidos. Esse fato é de conhecimento dos professores que afirmam que as aulas experimentais aumentam o aprendizado (GIORDAN, 1999).

A motivação das aulas experimentais com caráter construtivista faz com que os alunos busquem e confrontem informações, adquirindo assim mais conhecimento para explicar os problemas enfrentados (BARATIERI et al., 2008). Contudo, é necessário que antes da experimentação o professor avalie o conhecimento e as dificuldades que os alunos possuam (GUIMARÃES, 2009).

Com base no experimento realizado neste trabalho, ou seja, extração e atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia, é possível trabalhar com os alunos a química dos produtos naturais, enfatizando o estudo da química orgânica, visto que há uma gama de produtos naturais isolados e já identificados, o que possibilita uma abordagem sobre a grande diversidade de funções orgânicas existentes. Desta forma, o estudante poderá estabelecer uma ligação entre a química orgânica e o seu cotidiano (DIAS et al., 2014).

Utilizando as moléculas do eugenol e do acetato de eugenila (figura 14) é possível iniciar um estudo de funções orgânicas, visto que a partir das funções presentes

nestes produtos naturais (fenol, éter e éster), outras funções orgânicas podem ser abordadas.

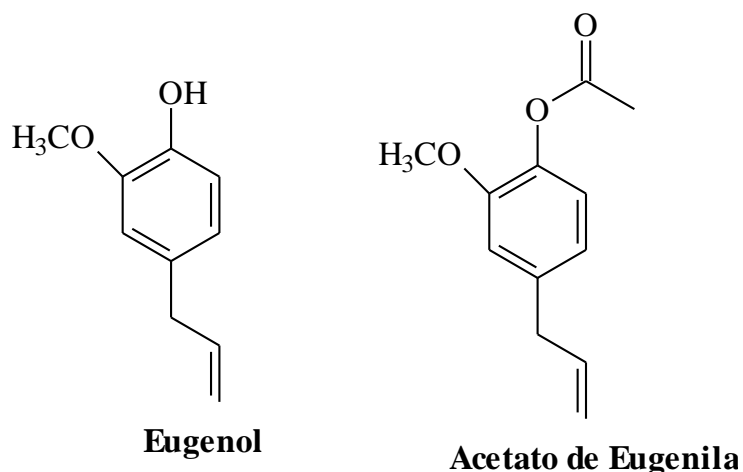


Figura 14 – Estrutura do eugenol e do acetato de eugenila (In: AFFONSO et al., 2014, p. 1319).

Através da propriedade inseticida deste óleo essencial é possível abordar aos alunos outro problema presente no cotidiano dos mesmos: a dengue. Esta doença, e a forma de evitar a proliferação do mosquito transmissor é algo que é constantemente abordado pela mídia, o que facilitaria criar uma ponte entre o cotidiano do aluno e um dos conteúdos a ser abordado, a propriedade biológica deste óleo essencial, mostrando que o mesmo pode ser utilizado como repelente ao mosquito. Além de explorar a parte química ao se ensinar a preparação de um de um extrato alcoólico (AFFONSO et al., 2012), visto que algumas secretarias de saúde vem incentivando o uso de repelente caseiro, feito a partir do cravo e utilizando como solvente o álcool, é possível desenvolver um trabalho interdisciplinar com a disciplina de biologia, a qual pode abordar o desenvolvimento deste mosquito e como ele se prolifera. Pode-se também, fazer uma junção entre a química e a área da saúde demonstrando as medidas que se podem tomar em casa para combater o mosquito da dengue. Esta abordagem pode ser feita após se propor a obtenção de um repelente caseiro feito pela preparação de um extrato alcoólico, ensinado pela própria Secretaria de Saúde (www.votorantim.sp.gov.br, 2015).

Aula Prática: Obtenção de um Repelente Caseiro

8.1 MATERIAIS E REAGENTES

400 mL de Álcool

10 gramas de cravo

100 mL de óleo de amêndoa

Filtro

8.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Deixar 10 gramas de cravo da Índia imersos em 400 mililitros de álcool, em um frasco fechado, por quatro dias, agitando todos os dias. Depois disso, é preciso filtrar o conteúdo e adicionar 100 mL de óleo de amêndoa, o qual melhora a fixação do repelente na pele (www.votorantim.sp.gov.br, 2015).

Após a preparação do repelente é possível abordar a razão de se utilizar o álcool como solvente e discutir o tema polaridade e solubilidade.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 MATERIAIS

- Placa de petri;
- Pinça;
- Pipeta 1 mL;
- Erlenmeyer;
- Becker de 1000 mL;
- Aparelho de Clevenger;
- Alça de platina;
- Papel de filtro whatman nº1;
- Tubo de ensaio;
- Pipetador automático;
- Alça de Drigask;
- Proveta de 500 mL;
- Bico de Bunsen;
- Balão Volumétrico 10 mL.

9.1.1 Equipamentos

- Estufa bacteriológica MA32 (MARCONI);
- Capela para plaqueamento (fluxo laminar) - Série 1341 - TROX;
- Auto-Clave Vertical – Phoenix - AV-30;
- Balança semi-analitica (Radwag WTB 300);
- Refratômetro Digital – Leica – AR200.
- Centrífuga – Celm – 3458

9.1.2 Reagentes

- Agar Brain Heart Infusion (ACUMEDIA) (Lote: 103,391);
- Agar EMB (eosina azul de metileno) (HIMEDIA) (Lote: VK4829742);
- TSB (Trypticase soy broth) (BACTO) (Lote: 4342224);
- Eugenol;
- Água destilada;
- Sulfato Anidro de Sódio.

9.1.3 Micro-organismos

As bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram cedidas pelo centro de pesquisa em ciências (CEPECI) da Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA).

9.1.4 Amostra

O botão floral do cravo foi adquirido em um estabelecimento comercial situado na cidade de Palmital/SP.

9.2 MÉTODOS

9.2.1 Extração do óleo essencial do cravo-da-índia

Para a extração do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), utilizou-se o sistema extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo

de 1000 mL, utilizando-se um bico de Bunsen como fonte geradora de calor (figura 15). Na extração do óleo essencial pesou-se 200 gramas do botão floral do cravo em 500 mL de água destilada, realizando-se 2 repetições. A partir da ebulição, a extração se estendeu por 2 horas. No término deste período, obteve-se o hidrolato. Este foi coletado em erlenmeyer, depois foi colocado em um funil de decantação para separação do óleo da água, após isso o óleo foi submetido à centrifugação para a retirada do excesso da água. Na segunda centrifugação foi adicionado sulfato anidro de sódio para a completa secagem do óleo.

A amostra foi armazenada em recipiente de vidro e mantido sob refrigeração para evitar a perda dos constituintes voláteis, o rendimento do óleo foi calculado na relação massa/massa.



Figura 15 - Sistema extrator de Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo de 1000 mL.

9.2.2 Preparo do inóculo

A cultura de *Staphylococcus aureus* foi inoculada em BHI (brain heart infusion) e a cultura de *Escherichia coli* foi inoculada em TSB (Trypticase soy broth). Após 24 horas de incubação a 37 °C procedeu-se a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10^8 microorganismos m.L⁻¹).

9.2.3 Preparo dos meios de cultivo

Os meios foram preparados conforme instruções de embalagem. Foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos e distribuídos em placas.

9.2.4 Plaqueamento

O procedimento foi realizado dentro da capela de fluxo laminar e todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados na autoclave.

9.2.4.1 Superfície

Com uma pipeta graduada foi adicionado 0,1 mL da bactéria *S. aureus* na superfície da placa contendo o meio BHI solidificado e 0,1 mL da bactéria *E. Coli* na superfície da placa contendo meio EMB solidificado e com uma alça de Drigaskl, previamente flambada, foram espalhadas nas placas.

9.2.5 Antibiograma

A atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo e do eugenol foi realizada pelo método de difusão de disco (MDD). O procedimento foi realizado dentro da capela de fluxo laminar e todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados na autoclave.

Com as placas já inoculadas, os discos de papel de filtro Whatman nº1, com 6 mm de diâmetro, foram impregnados individualmente com 20 µL de óleo essencial e 20 µL de eugenol, sendo colocados em cada placa com o auxílio de uma pinça. O teste foi feito em duplicata. Em seguida as placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Depois realizou-se a medição dos halos de inibição do crescimento bacteriano.

9.2.6 Características Físico-Químicas do óleo essencial

Na caracterização físico-química do óleo essencial foi utilizado os seguintes parâmetros: solubilidade em etanol a 90% v/v, índice de refração, aparência e odor.

9.2.6.1 Solubilidade em etanol a 90% v/v

Para a determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de álcool/água a 90% (v/v) mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólicas até a sua completa solubilização.

9.2.6.2 Índice de refração

A leitura foi feita a 20 °C com o óleo colocado diretamente sobre o prisma do refratômetro, para o qual foi utilizado uma pipeta.

9.2.6.3 Aparência

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

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de antibiograma realizado seguiu a metodologia de Rabêlo (2010) com adaptações. Foi constatado que o óleo e o eugenol apresentaram atividade na concentração de 20 μ L contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, visto que o halo de inibição foi superior a 8 mm. Os dados obtidos estão expressos na tabela 4.

BACTÉRIA	INIBIÇÃO (mm)	
	ÓLEO ESSENCIAL	EUGENOL
<i>Escherichia coli</i>	14	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	14

Tabela 4 - Resultados da incubação das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* após 24 horas.

A figura 16 mostra o crescimento da bactéria *E. coli* no meio EMB com discos impregnados com 20 μ L de óleo essencial e 20 μ L de eugenol, respectivamente, utilizando a técnica em superfície. Neste teste houve a formação do halo de inibição ao redor dos discos com a medida de 14 mm.



Figura 16 – Crescimento da bactéria *E. coli* em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo eugenol (esquerda) e óleo (direita).

A figura 17 mostra o crescimento da bactéria *S. aureus* no meio BHI com discos impregnados com 20 μL de óleo essencial e 20 μL de eugenol, respectivamente, utilizando a técnica em superfície. Neste teste houve a formação do halo de inibição ao redor dos discos com a medida de 14 mm.

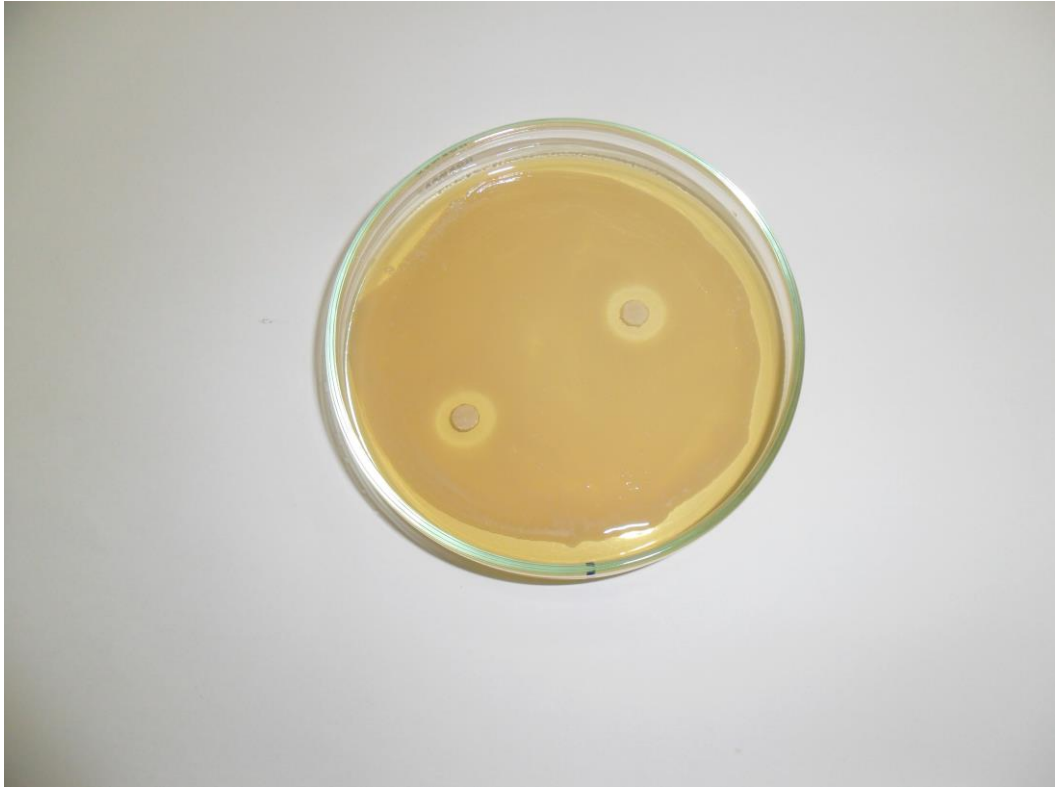


Figura 17 – Crescimento da bactéria *S. aureus* em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo eugenol (esquerda) e óleo (direita).

Rabêlo (2010) utilizou como padrão um trabalho que de maneira geral classifica a atividade de diferentes óleos essenciais de acordo com o halo de inibição (tabela 5). O halo inibitório considerado foi a área sem crescimento detectável a olho nu. Através desta observação foi possível observar que na quantidade de 20 μL houve inibição, uma vez que houve a formação de halo ao redor do disco. Segundo os parâmetros apresentados na tabela 5, a bactéria *E. coli* e a *S. aureus* mostraram ser sensíveis (+) frente ao o óleo essencial e o eugenol. No estudo feito por Rabêlo (2010), o óleo e o eugenol mostram ser muito sensíveis (++) , porém, a quantidade utilizada foi de 75 μL , o que justifica os valores de halos superiores encontrados para *E. coli* quando empregou-se o óleo (16 mm) e o eugenol (19 mm).

Sensibilidade	Halo (mm)
Não sensível (-)	Menor que 8
Sensível (+)	Entre 9-14
Muito Sensível (++)	Entre 15-19
Extremamente Sensível (+++)	Maior que 20

Tabela 5 – Classificação dos padrões de sensibilidade de diferentes óleos essenciais (MOREIRA et. al, 2005, p. 566).

De acordo com o estudo feito por Silvestri e colaboradores (2010), que realizaram atividade antimicrobiana do óleo essencial do cravo por dois métodos: o de difusão em placas e o método indireto de crescimento microbiano, ficou comprovado que as bactérias *E. coli* e *S. aureus* mostraram-se susceptíveis ao óleo essencial do cravo da Índia nos dois métodos.

Os óleos ricos em eugenol e outros aldeídos possuem uma boa atividade antibactericida. Diversos autores atribuem ao composto majoritário do óleo de cravo, o eugenol, não só o efeito bactericida, mas também outras propriedades biológicas. Entretanto, a ação conjunta dos vários compostos presentes nos óleos é denominada sinergismo, o que confere uma boa capacidade antibacteriana (RABÊLO, 2010).

Os resultados dos parâmetros físicos químicos estão expressos na tabela 6.

Parâmetros Físico-químicos	Óleo essencial
Solubilidade em etanol (90%)	1:2
Índice de refração (N _D 20°)	1,5348
Aparência	Límpido
Odor	Característico
Rendimento	5,64%

Tabela 6 – Parâmetros físico-químicos do óleo essencial do cravo-da-índia.

De acordo com a tabela 6 a solubilidade do óleo em etanol foi de 1:2. A aparência e o odor apresentados pelo óleo analisado foram considerados típicos.

O rendimento do óleo foi calculado pela quantidade de óleo que se obteve com a massa de vegetal usada. Obteve-se 7,29 gramas de óleo a partir de 200 gramas de botões florais, fornecendo um rendimento de 3,64 %. Este valor é próximo ao obtido por Rabêlo (2010) que obteve um valor de 3,54 %.

11. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que as duas bactérias testadas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* se mostraram sensíveis frente a concentração do óleo extraído e ao eugenol empregado, pois os halos formados foram superiores a 8 mm.

Apesar de não ter sido feita a caracterização via RMN ¹H e IV, a identificação do óleo essencial extraído foi feita através dos parâmetros físico-químicos obtidos, os quais estão de acordo com os descritos na literatura.

REFERÊNCIAS

-VOTORANTIM DECRETA ESTADO DE EMERGÊNCIA PARA COMBATER A DENGUE. Disponível em: <http://www.votorantim.sp.gov.br/portal/noticias/0/3/7584/Votorantim-decreta-estado-de-emerg%C3%Aancia-para-combater-a-dengue>. Acesso em: 27 set. 2015.

AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C.. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, Vol. 4, n. 2, 2012, p. 146-161.

AFFONSO, R.S.; LESSA, B.; SLANA, G. B. C. A.; BARBOZA, L.L.; ALMEIDA, F. V. de; LIMA, A. L. S.; SOUZA, F. R. de; FRANÇA, T. C. C.. Quantificação e Caracterização dos Principais Componentes do Extrato Etanólico de Cravo-da-Índia *Syzygium aromaticum* [L] Merr. et Perry. **Revista Virtual de Química**, V. 6, nº. 5, 2014, p. 1316-1331.

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – **Resistência Microbiana – Mecanismo e impacto clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm>. Acesso em: 09 ago. 2015.

ALBUQUERQUE, José Antônio Tavares. **Análise comparativa da transcrição de genes envolvidos na invasão e escape de *Escherichia coli* enteroinvasora e *Shigella flexneri* macrógafos J774**. 2006. 55p. Dissertação (mestrado) – Área de Análises Clínicas – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012, 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

ASCENÇÃO, Vanessa Louzeiro; FILHO, Victor Elias Mouchrek. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (CRAVO DA ÍNDIA). In **XXIV Encontro do SEMIC**, 2013, São Luís. Cad. Pesq., São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013.

AYALA, Claudia de Oliveira. **Sorologia de antígenos flagelados de amostras de *Escherichia coli* Enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli* produtoras da Toxina de Shiga (STEC) isoladas de diferentes animais e análise comparativa do gene de *fliC* por PCR-RFLP**. 2009. 62p. Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

BARATIERI, S. M.; BASSO, N. R. S.; BORGES, R. M. R.; FILHO, J. B. R. Opinião dos estudantes sobre a experimentação em química no Ensino Médio. **Experiências em Ensino de Ciências**, V.3, nº. 3, 2008, p.19-31

BARROS, Francisco Maikon Corrêa de; ZAMBARBA, Eduardo de Oliveira; HEINZMANN, Berta Maria, Variabilidade Sazonal e Biossíntese de Terpenóides Presentes no Óleo Essencial de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, V. 32, nº 4, 2009, p. 861-867.

BERTINI, Luciana Medeiros; PEREIRA, Alexsandra Fernandes; OLIVEIRA, Carla Loane de Lima; MENEZES, Everardo Albuquerque; MORAIS, Selene Mais de; CUNHA, Francisco Afrânio; CAVALCANTI, Eveline Solon Barreira. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste brasileiro. **Infarma**, Vol. 17, nº. 3/4, 2005, p. 80-83.

BIASI-GARBIN, Renata Perugini; OTAGUIRI, Eliane Saori; MOREY, Alexandre Tadachi; SILVA, Mayara Fernandes da; MORQUETTE, Ana Elisa Belotto; LANCHEROS, César Armando Contreras; KIAN, Danielle; PERUGINI, Márcia Regina Eches; NAKAZATO, Gerson; DURÁN, Nelson; NAKAMURA, Celso Vataru; YAMAUCHI, Lucy Megumi; YAMADA-OGATTA, Sueli Fumie. Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2015, 8 p.

BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C.; REZENDE, Claudia M.. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 2009, p. 588-594.

BUERIS, Vanessa. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial *in vitro***. 2008. 45 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CHAPAVAL, Lea; AGUIAR, Valdanya Mara Pereira; SOUSA, Ana Paula Brandão de; MIRANDA, Kessley Pereira de; MORORÓ, Alan Martins; MAGALHÃES, Daniele Cristina Timbó. **Cultura, Crescimento e Identificação de Bactérias do Gênero *Staphylococcus aureus* em Leite de Cabra**. 2009. Embrapa. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/admin/pdf/005135001245.ct41.pdf>> Acesso em: 05 ago. 2015.

COSTA, Cíntia Daniela Rodrigues da Silva. **Importância de *Staphylococcus spp.* Produtores de enterotoxinas em alimentos**. 2008. 34 p. Pós-graduação (Monografia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão; DE QUEIROZ, Danilo Caldas. Óleos essenciais e química fina. **Revista Química Nova**, Vol. 16, n. 03, 1993, p.224-228.

CRUVINEL, A,R; SILVEIRA, A,R; SOARES, J.S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no distrito federal. **Cenarium Farmacêutico**, n° 4, Maio/Nov, 2011, p. 1-11.

CRUZ, Elaine Drehmer de Almeida. ***Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* meticilina em trabalhadores de um hospital universitário: colonização e crenças em saúde**. 2008. 189p. . Tese (doutorado) – Departamento de Enfermagem- Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CULLER, Hebert Fabrício. **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. 32p. Dissertação (mestrado) – Departamento de Biotecnologia- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DAMINI, Wladimir. **Extração de óleos essenciais através da destilação por arraste a vapor, utilizando materiais alternativos**. 2003. 35p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de ensino Superior de Assis - IMESA.

DANIEL, Aparecido N.; SARTORETTO, Simone M.; SCHMIDT, Gustavo; CAPARROZ-ASSEF, Silvana M.; BERSANI-AMADO, Ciomar A.; CUMAN, Roberto Kenji N. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 19(1B), Jan-Mar – 2009, p. 212-217.

DIAS, H.P; PAIVA, D.S; ROMÃO, W; ENDRINGERA, D.C. Identificação de Polifenóis: Sequência Pedagógica para o Ensino Médio. **Revista Virtual de Química**. V.6, nº. 2, Mar/Abr. 2014, p.467-477.

Disponível em: < <http://www.pausaparafeminices.com/perfume/o-perfume-lady-lily-de-o-boticario/>>. Acesso em: 07 jul. de 2015.

ESCOBAR, Raimara Gonzalez. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Rev Cubana Estomatol**. Ciudad de La Habana, V. 39 nº. 2, agosto 2002. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200005&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 10 jul. 2015.

Extração do Eugenol - Destilação por arraste a vapor. Disponível em:<<http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp10/arraste.html>>. Acesso em: 08 jul. de 2015.

FERNANDES, Hellen Ciciliato de Paula. **Extração do óleo essencial da casca da laranja**. 2012. 46p. Trabalho de conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

FERNANDES, Iara Janaína; KIELING, Amanda Gonçalves; BREHM, Feliciane Andrade; AGOSTI, Aline; MORAES, Carlos Alberto Mendes. Avaliação da Extração de Óleo Essencial do Resíduo Casca de Laranja. In: 4º Fórum internacional de resíduos sólidos. 2013. Porto Alegre. **Anais do 4FIRS**, 2013.

FERRONATTO, Regina; MARCHESAN, Eli Danieli; PEZENTI, Emanuelli; BEDNARSKI, Franciela; ONOFRE, Sideney Becker. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 17(2), Abr./Jun. 2007, p.224-230.

FRANCO, Robson Maia. ***Escherichia coli*: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguagem frescal do tipo toscana**. 2002. 144 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2002.

GELATTI, L.C.; BONAMIGO, R.R.; BECKER, A.P.; AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **AnBrasDermatol**. nº 84, V. 5, 2009, p. 501-506.

GIORDAN, MARCELO. O papel da Experimentação no ensino de ciências. **Química Nova na Escola**, nº. 10, novembro, 1999, p.43-49.

GODINHO, Grazielle Cristina. **Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço**. 2012. 79p. Trabalho de conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

GOMES, Fabiana. **Estudo dos compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (EFS)**. 2003. 77 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GUIMARÃES, Cleidson Carneiro. Experimentação no Ensino de Química: Caminhos e descaminhos rumo à aprendizagem significativa. **Química Nova na Escola**, V. 31, nº. 3, agosto, 2009, p.198-202.

KASNOWSHI, Maria Carmela. **Listeria spp.; Escherichia coli: Isolamento, identificação, estudos sorológicos e antimicrobiano em cortes de carne bovina (alcatra) inteira e moída**. 2004. 111p. Dissertação (mestrado) – Instituto de Medicina Veterinária – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2004.

LEITE, G.B. **Análise de portadores assintomáticos de Staphylococcus aureus no Hospital Universitário de Brasília**. 2008. 100p. Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Patologia Molecular - Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

LIMA, Felipe Crescêncio. **Relaxamento do músculo liso traqueal de rato pelo eugenol**. 2009. 87p. Dissertação (mestrado) - Universidade estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2009.

LIMA, Igara de Oliveira; OLIVEIRA, Rinalda de Araújo Guerra; LIMA, Edeltrudes de Oliveira; FARIAS, Nilma Maria Porto; SOUZA, Evandro Leite de. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 16(2), Abr./Jun. 2006, p. 197-201.

LINARD, Cybelle Façanha Barreto Medeiros. **Estudo do efeito antinociceptivo do Eugenol**. 2008. 90p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2008.

LOREGIAN, André. **Comparação entre dois métodos de extração e caracterização de óleos essenciais de plantas do horto de plantas medicinais do grupo PET – agronomia UTFPR – Pato Branco**. 2013.45 p. Trabalho de conclusão de Curso (Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

MACHADO, Bruna Fernanda Murbach Teles; JUNIOR, Ary Fernandes. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos acadêmicos**, Tubarao, v. 3, nº. 2, p. 105-127, 2011.

MAIA, Tatiana Faria; DONATO, Alexandre De; FRAGA, Marcelo Elias. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Plantas, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, V. 17, nº 1, 2015, p. 105-116.

MANON, Iahel. Canela-da-índia e cravo-da índia. **Revista Educação Ambiental em Ação**, ano I, nº. 2. set. 2002.

MARTINS, André Gustavo Lima de Almeida. **Atividade antibacteriana dos óleos do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças**. 2010. 179p. Tese (doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

MARTINS, André Gustavo Lima de Almeida; NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro; FILHO, João Elias Mouchrek; FILHO, Nestor Everton Mendes; SOUZA, Antonio Gouveia; ARAGÃO, Natanael Eudes; SILVA, Diôgo Sérgio Vieira da. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.8, ago, 2010, p.1791-1796.

MAZZAFERA, Paulo. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. **Revista Brasil. Bot.**, V. 26, nº. 2, jun. 2003, p. 231-238.

MITTELSTAEDT, Simone; CARVALHO, Vânia Maria. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O155:H7. **Revista Instituto Ciência e Saúde**, v. 34, nº. 3, jul-set, 2006. p. 175-82.

MORAIS, Selene Maia de; JÚNIOR, Francisco Eduardo Aragão Catunda; SILVA, Ana Raquel Araújo da; NETO, Jason Stone Martins; RONDINA, Davide; CARDOSO, José Henrique Leal. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**. Vol. 29, No. 5, 2006, p. 907-910.

MORAIS; Selene M. de; CAVALCANTI, Eveline S. B.; COSTA, Sônia Maria O.; AGUIAR, Liza A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 19(1B). Jan./Mar. 2009, p. 315-320.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; VALLE, C.E. del; ROUR, S.I.; Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT**. V. 38, 2005, p. 565-570.

NASCIMENTO, Paula F.C.; NASCIMENTO, Analuiza C.; RODRIGUES, Carolina S.; ANTONIOLLI, Ângelo R.; SANTOS, Patrícia O.; JÚNIOR, Antônio Márcio Barbosa; TRINDADE, Rita C.. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 17(1), Jan./Mar. 2007, p. 108-113.

NEUWIRTH, Amanda; CHAVES, Ana Letícia Rocnieski; BETTEGA, Janine Maria Ramos. **Propriedades dos óleos essenciais de cipreste, lavanda e hortelã – pimenta**. 2008. 13p. Resumo de um Trabalho de conclusão de Curso – Universidade do Vale do Itajaí, Balneário Camboriú, Santa Catarina – Univali.

OLIVEIRA, Rosilene Aparecida de; REIS, Tâmara Vieira; SACRAMENTO, Célio Kersul do; DUARTE, Lucienir Pains; OLIVEIRA, Fernando Faustino de. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de farmacognosia**, V. 19, nº 3, Julho/setembro, 2009, p 771-775.

OLIVEIRA, Sonia Maria Marques de; JOSE, Vera Lucia Age. Processos de extração de óleos essenciais. In: **Dossiê Técnico**. Serviço Brasileiro de respostas técnicas. Paraná, 2007, 29p.

ORLANDA, José Fábio França. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)**. 2011. 105 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.

RABÊLO, Waléria Ferreira. **Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*)**. 2010. 79p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, São Luís, 2010.

RATTI, R. P.; SOUSA, C. P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, V. 2, nº 30, 2009, p. 137-143.

RIBEIRO, Camila dos Santos Padovani. **Determinação espectrofotométrica de Flavonoides Totais presentes nas folhas de Arruda (*Ruta Graveolens* L)**. 2014. 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) - Fundação Educacional do Município de Assis/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

RODRIGUES, Juliana Falcão. **Diversidade genética do óperon *etx* em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) determinação das sequências gênicas e capacidade da síntese da toxina termo-lábil (LT)**. 2009. 30p. Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, Maria Regina Alves. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 181p. Tese (doutorado) – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2002.

SALES, L. M.; SILVA, T. M.; *Staphylococcus aureus* meticilina resistente: um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**. V. 3, nº 1, 2012, p. 1-13.

SAMEGIMA, Danyelle Amélia Grecco. **Algumas propriedades de virulência de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com doença inflamatória intestinal**. 2008. 51p. Dissertação (mestrado) – Departamento de Microbiologia – Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O; FREITAS C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, L. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C; *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras. Patol. Med. Lab.**, V. 43. nº. 6, 2007, p. 413-423.

SANTOS, Luís Gustavo Martinez dos; CARDOSO, Maria das Graças; LIMA, Rafaela Karin de; SOUZA, Paulo Estevão; GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima; ANDRADE, Milene Aparecida. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (l.) merr & perry (cravo-da-índia). **TECNO-LÓGICA**, Santa Cruz do Sul, V. 11, nº. 1, p. 11-14, jan./dez. 2007.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, V. 11, nº.4, p. 442-449, 2009.

SHREVE, R. N. e BRINK Jr., J.A. **Indústrias de Processos Químicos**, 4ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A, 1997.

SICHERI, Ana Paula Marques Pino. **Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. 2013. 126p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2013.

SILVA, Érica Aparecida Souza. **Estudos dos óleos essenciais extraídos das resinas de espécies *Protium* spp.** 2006. 151p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006

SILVA, Juliana Azevedo; SILVA, Wilmar Dias. *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* COMENSAL, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista UFG**, v. 34, nº. 3, set-dez, 2005. p.175-196.

SILVEIRA, Jeniffer Cristina; BUSATO, Nathália Viégas; COSTA, Andréa Oliveira Souza da; JUNIOR, Esly Ferreira da Costa. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.2038, 2012.

SILVESTRI, Jandimara Doninelli Fior; PAROUL, Natalia; CZYEWski, Eliane; LERIN, Lindomar; ROTAVA, Ieda; CANSIAN, Rogério Luis; MOSSI, Altemir; TONIAZZO, Geciane; OLIVEIRA, Débora de; TREICHEL, Helen. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, vol. 57, n. 05, set-out, 2010, p. 589-594.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed.; UFRGS: Porto Alegre/ Florianópolis, 2000.

SOUZA, João Luis Carvalho. **Análise do efeito inibitório do eugenol sobre canais para Na⁺ ativados por voltagem em neurônios sensitivos**. 2009. 33p. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOUZA, Sara Anizelli Manganotti; MEIRA, Messulan Rodrigues; FIGUEIREDO, Lourdes Silva de; MARTINS, Ernane Ronie. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, V.6, nº.10, 2010.

SOUZA, Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de. **Efeito antinociceptivo e anti-edematogênico do Eugenol**. 2007. 84p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza, 2007.

STARK, Lisa. **Staphylococcus aureus - aspects of pathogenesis and molecular epidemiology**. 2013. 81 p. Doctoral thesis. Linköping University, Department of Clinical and Experimental Medicine. Linköping University, Faculty of Health Sciences. 2013.

TAJUDDIN, Ahmad S; LATIF, A; QASMI, IA. Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behaviour of normal male rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 2004; 4:17. doi:10.1186/1472-6882-4-17.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.. **Microbiologia**, 8ª. ed. Tradução de Roberta Marchiori Martins. Porto Alegre. Editora Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

VANIN, A.B.; PUTON, B.; ORLANDO, T.;PIAZZA, S.; PAROUL, N.; CANSIAN, R.L. Avaliação da toxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*) e do éster acetato de eugenila através do ensaio de bioletalidade utilizando *Artemia salina*. In: 5º Simpósio de segurança alimentar. 2015. Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul. **Anais do SSA5**. Bento Golçalves, 2015. 4p.

VANIN, Adriana Biasi. **Produção, propriedades biológicas, antioxidantes e toxicidade do bioaromatizante obtido via esterificação enzimática de óleo essencial do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus*)**. 2014. 139 p. Tese (doutorado) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul, Erechim, 2014.

VEIGA, Márcia S. Mendes; QUENENHEMM, Alexandra; CARGENIN, Claudete. **O Ensino de química: algumas reflexões.** Londrina. Disponível em: <<http://www.uel.br/eventos/jornadadidatica/pages/arquivos/O%20ENSINO%20D E%20QUIMICA.pdf>>. Acesso em: 22 de set, 2015.

VICTÓRIO, Cristiane Pimentel; LAGE, Celso Luis Salgueiro. Uso de plantas medicinais. **Revista Arquivos FOG – Saúde, Sociedade, Gestão e Meio Ambiente**, vol. 5, 2008, p. 33-41.

WIEST, J.M; CARVALHO, H.H.C.; AVANCINI, C.A.M.; GONÇALVES, A.R. Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Ciênc. Technol. Aliment**, jul./set, 2009, p.474-480.