



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

**ANA LÉIA DE SOUZA GARCIA**

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO ALHO COMERCIAL**

**Assis/SP**

**2017**



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

**ANA LÉIA DE SOUZA GARCIA**

**EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO ALHO COMERCIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA e a Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA, como requisito parcial à obtenção do Certificado de Conclusão.

**Orientanda: Ana Léia de Souza Garcia**

**Orientador: Prof. Me. Alexandre V. G. Mazalli**

**Assis/SP  
2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

GARCIA, Ana Léia de Souza

Extração e atividade antibacteriana de compostos bioativos presente no alho comercial / Ana Léia de Souza Garcia. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA - Assis, 2017.

52p.

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

Orientador: Prof. Ms. Alexandre V. G. Mazalli

1. Alho 2. Compostos bioativos 3. Antibiograma

CDD: 660

Biblioteca da FEMA

# EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NO ALHO COMERCIAL

ANA LÉIA DE SOUZA GARCIA

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

Orientador: Prof.º Me. Alexandre V. G. Mazalli

Analisador: Prof.ª Me. Elaine Amorim Soares

**Assis/SP**

**2017**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter me dado forças no decorrer do processo, a minha querida família, pelo carinho, dedicação, apoio e incentivo a minha formação profissional.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao meu marido por todo suporte que me forneceu durante esta caminhada, pelas palavras de conforto quando precisei, por todo apoio e incentivo.

A minha rainha, que além de minha mãe, sempre foi minha companheira e amiga, a quem tenho total admiração e carinho.

Ao Alexandre que além de meu orientador, foi meu professor e amigo, a quem tenho total admiração e carinho. Obrigada por acreditar no meu potencial.

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

Aos meus professores Cleiton, Patrícia, Idécio, Rosângela, Mary, Bia, Marcia, Gilce, Martinha, Douglas, Fernando, Marcelo, Viviane, Sílvia, Manfio e Ébano que contribuíram diretamente para a minha formação. Obrigada por todas as conversas e alegrias compartilhadas.

Ao pessoal do CEPECI, em especial a Giovanna não só pela ajuda, mas também por todas as conversas que compartilhamos.

“Os professores abrem a porta,  
mas você deve entrar por você  
mesmo.”

Provérbio Chinês

“O segredo de qualquer conquista é  
saber o que fazer com ela.”

Desconhecido

## RESUMO

Há muito tempo os produtos de origem vegetal como os extratos têm sido empregados em diversas aplicações na medicina popular. Os compostos bioativos do alho (*Allium sativum*) extraído via aquosa, metanólica e etanólica, tem como constituinte mais abundante a alicina ou di-propenyl tiosulfonato 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 pelos compostos bioativos do alho, o objetivo deste trabalho é extrair compostos bioativos do alho e verificar sua atividade antimicrobiana perante as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Para a extração dos compostos bioativos, utilizou-se 3 gramas de alho e 20 mL de água destilada, 20 mL de etanol e 20 mL de metanol realizando-se 3 repetições. Após a extração, este foi submetido à centrifugação. A atividade antibacteriana dos compostos bioativos do alho foi realizada pelo método de difusão de disco (MDD). Através do teste de antibiograma realizado constatou-se que os compostos fenólicos e organosulfurados apresentaram atividade na concentração de 20 µL contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, visto que o halo de inibição foi superior a 8 mm para ambas as bactérias. A atividade antibacteriana dos compostos bioativos 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 dos compostos bioativos do alho extraído, pois os halos formados foram superiores a 8 mm.

**Palavras-chave:** alho; compostos bioativos; antibiograma

## ABSTRACT

Products of plant origin such as extracts have long been used in various applications in folk medicine. Bioactive garlic (*Allium sativum*) compounds extracted via aqueous, methanol and ethanol have the most abundant constituent allicin or di-propenyl thiosulfinate which has several biological activities, such as anti-inflammatory, healing, analgesic, antioxidant, antitumor, insecticide, antibacterial, among others. The objective of this work is to extract bioactive compounds from garlic and verify its antimicrobial activity against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The objective of this work is to extract bioactive compounds from garlic and to verify their antimicrobial activity against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The objective of this work is to extract bioactive compounds from garlic and to verify their antimicrobial activity against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. For the extraction of the bioactive compounds, 3 grams of garlic and 20 mL of distilled water, 20 mL of ethanol and 20 mL of methanol were used, with 3 replicates. After extraction, it was subjected to centrifugation. The antibacterial activity of the bioactive compounds of garlic was performed by the disc diffusion method (MDD). The phenolic and organosulfur compounds showed activity in the concentration of 20  $\mu$ L against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, since the inhibition halo was higher than 8 mm for both bacteria. The antibacterial activity of the bioactive compounds was assigned according to the inhibition halo, following the classification of the sensitivity standards. The results show that the two bacteria tested *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were sensitive to the concentration of the bioactive compounds of the extracted garlic, since the halos formed were greater than 8 mm.

**Keywords:** garlic; bioactive compounds; antibiogram

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Partes do alho: A) Cabeça, B) folha, C) bulbo e talo.....	18
Figura 2 - Visão simplificada das principais vias de biossíntese de compostos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.....	21
Figura 3 - Estrutura química da quercetina, apigenina e miricetina.....	21
Figura 4 - Reações químicas dos principais compostos organosulfurados encontrados no alho.....	23
Figura 5 - Formação do composto organosulfurado alicina.....	25
Figura 6 - Colônia <i>S. aureus</i> apresenta coloração preta em meio telurito-glicina...	26
Figura 7 - Micrografia de <i>Escherichia coli</i> .....	28
Figura 8 - Curva de calibração do Ácido Gálico utilizada na determinação dos compostos fenólicos.....	37
Figura 9 - Curva de calibração do Ácido Pirúvico utilizada na determinação dos compostos organosulfurados.....	38
Figura 10 - Crescimento da bactéria <i>E. coli</i> em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo extratos de alho em água (direita em cima) , etanol (direta em baixo) e metanol/água (esquerda).....	40
Figura 11 - Crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo extratos de alho em água (direita em cima), etanol (direta em baixo e esquerda em baixo) e metanol/água (esquerda em cima).	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição centesimal do alho.....	19
Tabela 2 -	Teor de fenólicos totais (média $\pm$ desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho.....	38
Tabela 3 -	Teor de organosulfurados (alicina) (média $\pm$ desvio padrão), em base seca, dos extratos de alho.....	38
Tabela 4 -	valores de compostos fenólicos encontrados na literatura. * mg/EAC/100g.....	39
Tabela 5 -	Resultados da incubação das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> após 24 horas.....	40
Tabela 6 -	Classificação dos padrões de sensibilidade (MOREIRA et. al, 2005, p. 566).....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
BPA	Baird Parker Agar
CEPECI	Centro de Pesquisas em Ciências
EAC	Equivalente de ácido clorogênico
EAG	Equivalente de ácido gálico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FEMA	Fundação Educacional do Município de Assis
HPLC	High performance liquid chromatography
MDD	Método de difusão de disco
MSOL	Planta macho cultivada em sol
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
RMN 1H	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TSB	Trypticase soy broth

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>ALHO (<i>Allium sativum</i>).....</b>	<b>18</b>
<b>3.</b>	<b>COMPOSTOS BIOATIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1.	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
3.2.	COMPOSTOS ORGANOSULFURADOS.....	22
3.2.1.	Compostos organosulfurados em alho fresco intacto.....	22
3.2.2.	Compostos organosulfurados em alho fresco picado.....	24
<b>4.</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>5.</b>	<b><i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>MEIO DE CULTURA E INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS.....</b>	<b>30</b>
6.1.	MATERIAIS.....	30
6.2.	MÉTODO.....	31
<b>7.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
7.1.	MATERIAIS.....	32
7.1.1.	Equipamentos.....	32
7.1.2.	Reagentes e meios de cultivo.....	33
7.1.3.	Micro-organismos.....	33
7.1.4.	Amostra.....	33
7.2.	MÉTODOS.....	34
7.2.1.	Extração dos compostos fenólicos do alho.....	34
7.2.2.	Determinação de compostos bioativos.....	34

7.2.2.1.	Determinação de compostos fenólicos totais.....	34
7.2.2.2.	Determinação de compostos organosulfurados (alicina).....	35
<b>7.2.3.</b>	<b>Preparo do inóculo.....</b>	<b>35</b>
<b>7.2.4.</b>	<b>Preparo dos meios de cultivo.....</b>	<b>36</b>
<b>7.2.5.</b>	<b>Plaqueamento.....</b>	<b>36</b>
<b>7.2.6.</b>	<b>Antibiograma.....</b>	<b>36</b>
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Os homens perceberam há milhões de anos a importância que as plantas medicinais possuem para a saúde humana. Desde então, pesquisas são realizadas para que haja um melhor aproveitamento desses benefícios. Plantas medicinais são aquelas que em sua estrutura tem alguma substância que possui atividade biológica, estando seu uso associado à medicina popular (VICTÓRIO; LAGE, 2008; ASCENÇÃO; FILHO, 2013; MARTINS et al., 2010). *Allium sativum*, o alho, é um antigo conhecido não apenas da culinária, mas também da medicina popular. Pertence a família *Liliáceae* e acredita-se que tenha origem egípcia (BONTEMPO, 2007; COSTA, 1994).

Cerca de 1500 a. C., seu uso medicinal já era realizado pelos egípcios quando o indicavam em casos de cardiopatias, feridas, tumores, parasitoses e cefaleia (CHARLAB et al., 2005). Pasteur, no século XIX, relatou sua atividade antibacteriana. Alguns testes realizados *in vitro* e *in vivo* também apresentaram para o alho atividade antibacteriana, antimicótica, antiviral, antitumoral, antiflogística e fibrinolítica (BONTEMPO, 2007; SIMÕES et al., 2000).

Podemos encontrar em sua composição fitoquímica: a alicina (di-propenyl tiosulfonato) que age na destruição e inibição de bactérias gram-negativas, sendo o principal componente do alho, muito volátil, este é responsável pela defesa do alho contra os micro-organismos da terra, o tiosulfato (antibiótica, antiviral e antifúngica) e a aliina (hipotensor, hipoglicemiante), escordinina (hipotensora, aumenta a utilização de B1 e antibacteriana), vitaminas A, B e C, proteínas e sais minerais (BONTEMPO, 2007; COSTA, 1994).

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

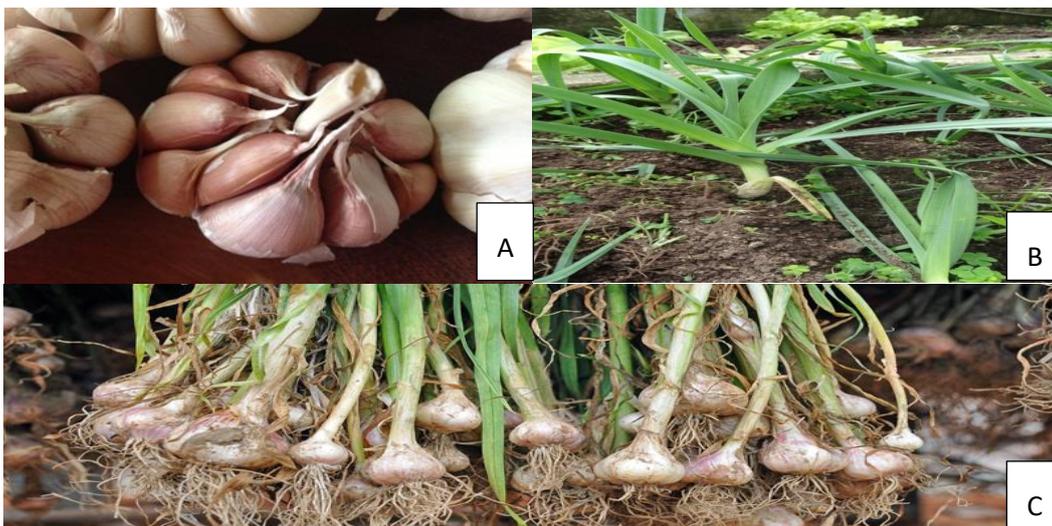
Considerando a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o combate à resistência bacteriana e as diversas atividades biológicas apresentadas pelo alho, o objetivo deste trabalho é extrair compostos bioativos do alho comercial e verificar sua

atividade antimicrobiana perante as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa).

## 2. Alho (*Allium sativum*)

Alho (*Allium sativum* L.), da família *Liliáceae*, que é constituída por mais de 700 espécies, dentre elas a cebola, alho-poró e a cebolinha, é uma planta assexuada que se propaga através do plantio dos bulbilhos ou dentes (CAMARGO; BARREIRA, 1985; BATATINHA; BOTURA; SANTOS, 2005). Foi descoberto no Egito, por volta de 3.700 a.C., onde já era usado como medicamento (FENWICK; HANLEY, 1985; BLOCK, 1985)

A especiaria se apresenta em um bulbo arredondado, denominado popularmente de cabeça, composta por 10 a 12 dentes, envolvidos por uma casca, que pode ser branca, rosada ou roxa. Do bulbo ou cabeça, desenvolve-se um talo, longo e fino (figura 1). Apresenta folhas longas e achatadas como capim, cultivada em canteiros. A hortaliça tem preferência por clima frio (MOTA et al., 2002). Existem variados tipos de alho com diferentes tamanhos, formas, cores, sabores, número de dentes por bulbo, acidez e capacidade de armazenamento, mas a contribuição para a saúde não varia (ALMEIDA et al., 2006).



**Figura 1:** Partes do alho: A) Cabeça, B) folha, C) bulbo e talo. (In: AFFONSO et al., 2012, p. 149).

A produção brasileira de alho nas décadas de 60 e 70 era localizada nos estados de Goiás e Minas Gerais, onde eram cultivados os alhos de baixo valor comercial, alhos comuns e brancos. Só na década de 80 foi incrementada a produção dos alhos roxos e nobres, abastecendo assim 90% do consumo nacional na safra de 1988/89. No final dos anos 80 e início da década de 90 a faixa de cultivo de alho no Brasil era de 18 mil hectares. A participação do alho nacional no abastecimento está em torno de 30%, com uma faixa de plantio de 9,6 mil sendo 8 mil hectares com alho nobre roxo (ANAPA, 2009).

O país que mais consome alho no mundo é o Brasil, tendo sua maior comercialização na forma *in natura*, mesmo com o crescimento gradativamente de pastas e outros produtos processados de alho (OLIVEIRA; MANHAES, 2003; OLIVEIRA; MELO, 2004). Tendo um aumento significativo no consumo per capita, passou de 0,49 Kg/habitante/ano no ano de 1961, para mais de um quilo em 2007 (ANAPA, 2009).

A importância nutricional na dieta é relativamente pequena, como mostra a tabela 1, apesar do uso frequente em diversos preparos culinários, uma vez que utilizamos pequenas quantidades. Em compensação, foram identificados vários compostos bioativos, com maior importância os fenólicos e os organosulfurados (OLIVEIRA; MELO, 2004).

<b>NUTRIENTES</b>	<b>UNIDADE</b>	<b>VALOR P/ 100g</b>
<b>Calorias</b>	Kcal	113,00
<b>Umidade</b>	g	67,50
<b>Proteínas</b>	g	7,00
<b>Lipídeos</b>	g	0,20
<b>Carboidratos</b>	g	23,90
<b>Fibra alimentar total</b>	g	4,30
<b>Cinzas</b>	g	1,30
<b>Cálcio</b>	mg	14,00
<b>Ferro</b>	mg	0,80
<b>Magnésio</b>	mg	0,24
<b>Fosforo</b>	mg	149,00
<b>Potássio</b>	mg	535,00
<b>Sódio</b>	mg	5,00
<b>Zinco</b>	mg	0,80
<b>Cobre</b>	mg	0,15
<b>Manganês</b>	mg	0,24
<b>Tiamina</b>	mg	0,18
<b>Riboflavina</b>	mg	Tr
<b>Vitamina B6</b>	mg	0,44

**Tabela 1** - Composição centesimal do alho (In: TACO tabela brasileira de composição de alimentos 2ª ed., 2006)

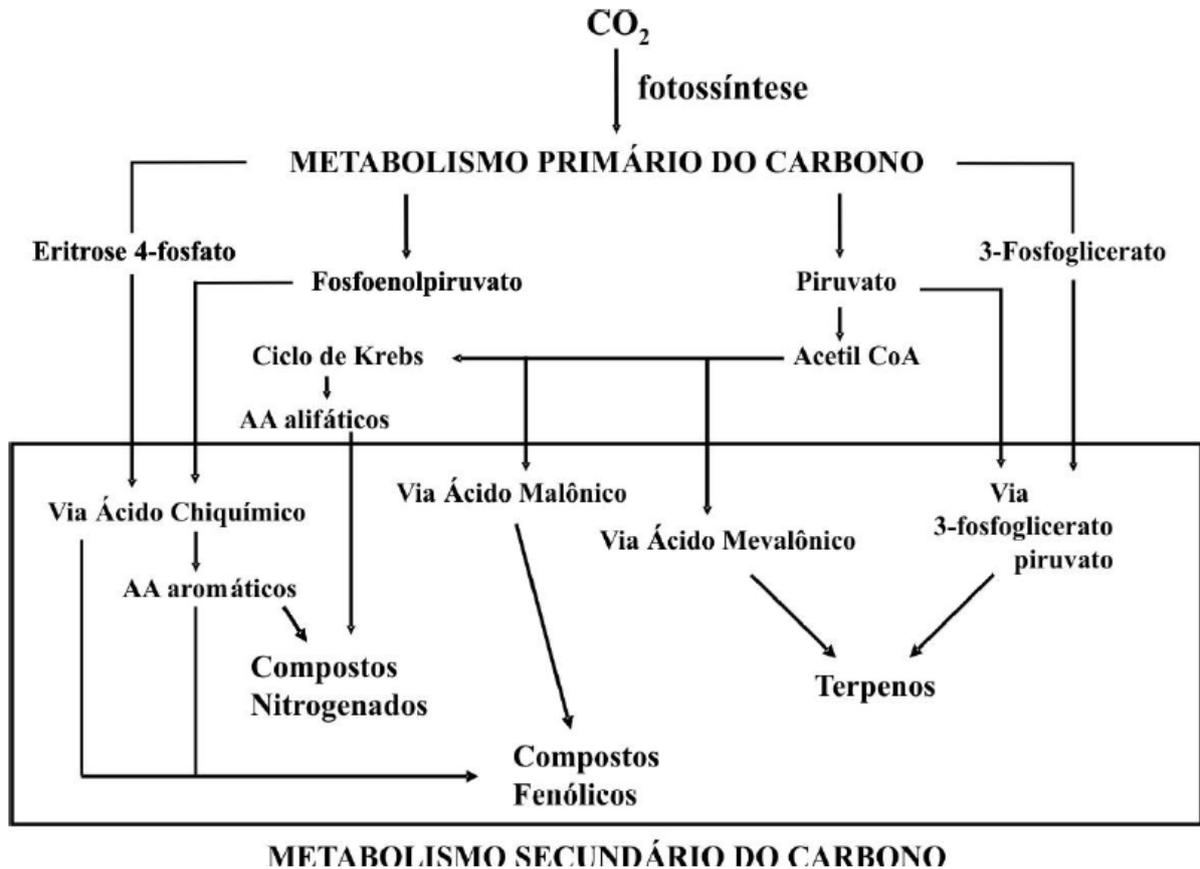
### 3. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os compostos bioativos apresentam várias funções biológicas e estruturas químicas. No entanto, possuem algumas características em comum: pertencem ao reino vegetal, são substâncias orgânicas que são produzidas pelos vegetais como uma espécie de proteção que os defendam das agressões da natureza, tais como: sol, calor e algumas pragas. Mesmo não sendo essenciais ou sintetizados pelo organismo humano, apresentam ação protetora, contribuem para o bom funcionamento dos órgãos ou até no combate de doenças, desde que presentes na alimentação em quantidades significativas. Essas substâncias exercem várias ações biológicas, como atividade antioxidante, modulação do sistema imune, controle do metabolismo hormonal, redução da pressão sanguínea, entre outras atividades como antibacteriana e antiviral (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; COZZOLINO; COMINETTI, 2013; HORST; MORENO, 1998).

O alho possui compostos bioativos que são responsáveis pelo sabor, odor, aroma e ação antibacteriana, em destaque os compostos fenólicos e os organosulfurados (LIMA et al., 2006).

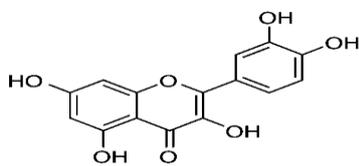
#### 3.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os vegetais são fontes alimentares contendo vários compostos químicos, habitualmente chamados de fitoquímicos (BRAVO, 1998; KRIS-ETHERTON et al. 2004). Mais de 8.000 moléculas conhecidas e distribuídas na natureza fazem parte da classe dos fitoquímicos, os compostos fenólicos, que são resultado do metabolismo secundário dos vegetais através de duas vias principais: via ácido chiquímico e via ácido malônico como mostra a figura 2 (HAGERNAM et al., 1997; CARDOZO et al. 2007).

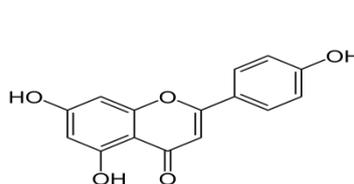


**Figura 2:** Visão simplificada das principais vias de biossíntese de compostos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário (CARDOZO et al., 2007, p. 102)

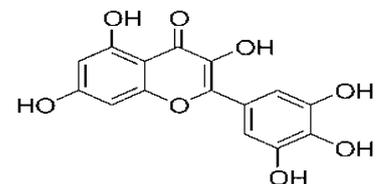
O alho apresenta compostos fenólicos, os flavonoides (figura 3): quercetina (flavonol), apigenina (flavona) e miricetina (flavonol) (EGEN-SCHWIND et al., 1992; BOREX, 2001; MIEAN; MOHAMED, 2001; NUUTILA et al., 2003; LANZOTTI, 2006).



quercetina



apigenina



miricetina

**Figura 3:** Estrutura química da quercetina, apigenina e miricetina (In: NUUTILA et al., 2003, p. 98)

## 3.2. COMPOSTOS ORGANOSULFURADOS

No alho contém 33 compostos organosulfurados, podendo ser encontrado de 11 a 35 mg em cada grama do alho fresco (FENWICK; HANLEY, 1985; OMAR; AL-WABEL, 2010). Essa porcentagem sofre oscilações, dependendo de sua variedade, condições climáticas, composição do solo, grau de maturação, além de etapas posteriores da cadeia produtiva, tais como: processamento, armazenamento e manipulação (HOLUB et al., 2002).

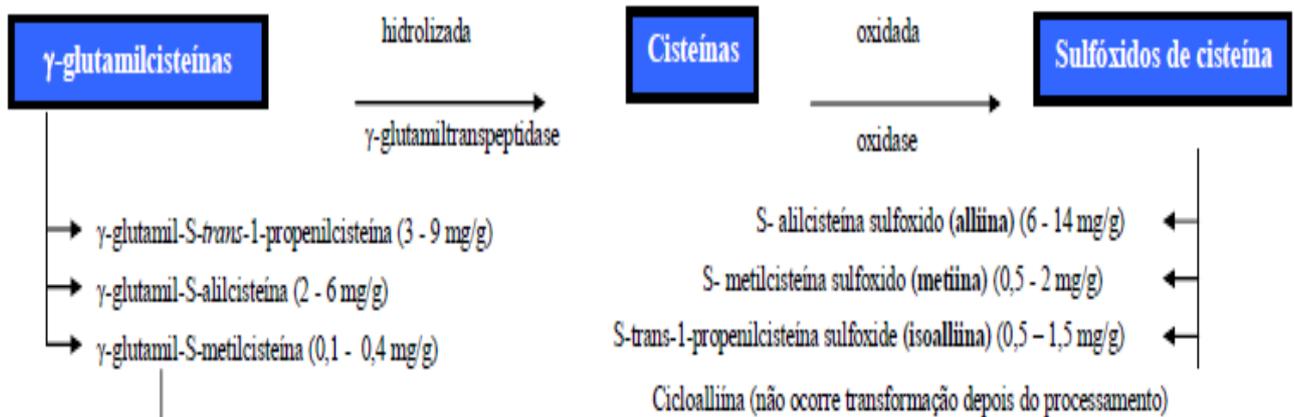
### 3.2.1. Compostos organosulfurados em alho fresco intacto

Em alho fresco e intacto é encontrado dois principais compostos organosulfurados: os sulfóxidos de cisteína (essencialmente a aliina, e em menores quantidades a metiina e a isoaliina) e as  $\gamma$ -glutamilcisteínas (principalmente  $\gamma$ -glutamil-S-*trans*-1-propenilcisteína e em menor quantidade de  $\gamma$ -glutamil-S-alilcisteína e da  $\gamma$ -glutamil-S-metilcisteína) (HOLUB et al., 2002; LANZOTTI, 2006).

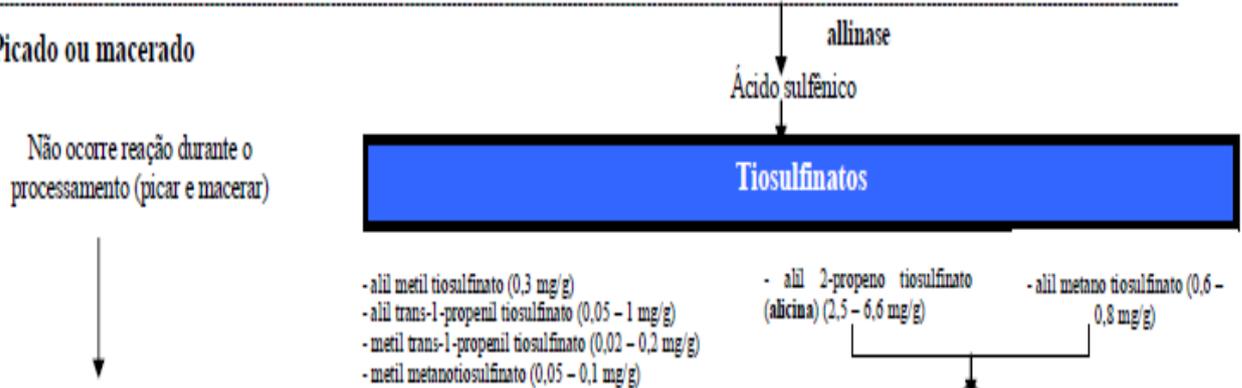
Sulfóxidos de cisteína são compostos cristalinos, de cor branca, inodoro quando sólido altamente solúvel em água e insolúveis na maioria dos solventes orgânicos. Os compostos  $\gamma$ -glutamilcisteínas são reservas para formação das cisteínas, que futuramente serão convertidos em sulfóxidos de cisteína, como apresentado na figura 4, item a. No decorrer do plantio, da germinação e do armazenamento, somente uma parte das  $\gamma$ -glutamilcisteína são sucessivamente hidrolisadas e depois oxidadas para estruturar os sulfóxidos de cisteínas com o aumento dos níveis da enzima  $\gamma$ -glutamiltranseptidase, havendo aumento da formação com o decréscimo da temperatura (HOLUB et al., 2002).

Já as  $\gamma$ -glutamilcisteínas restantes, são convertidas em S-alilcisteína (SAC) e S-1-propenilcisteína, sendo extraídas em água, por um período longo (figura 4, item c). 95% do total de enxofre nos alhos frescos resultam da soma de sulfóxido de cisteína (8-19mg/g) e da  $\gamma$ -glutamilcisteína (5-16 mg/g). As  $\gamma$ -glutamilcisteínas são encontradas apenas nos bulbos, já os sulfóxidos de cisteína, estão presentes nos bulbos (85%), folhas (12%) e nas raízes (2%) (HOLUB et al., 2002).

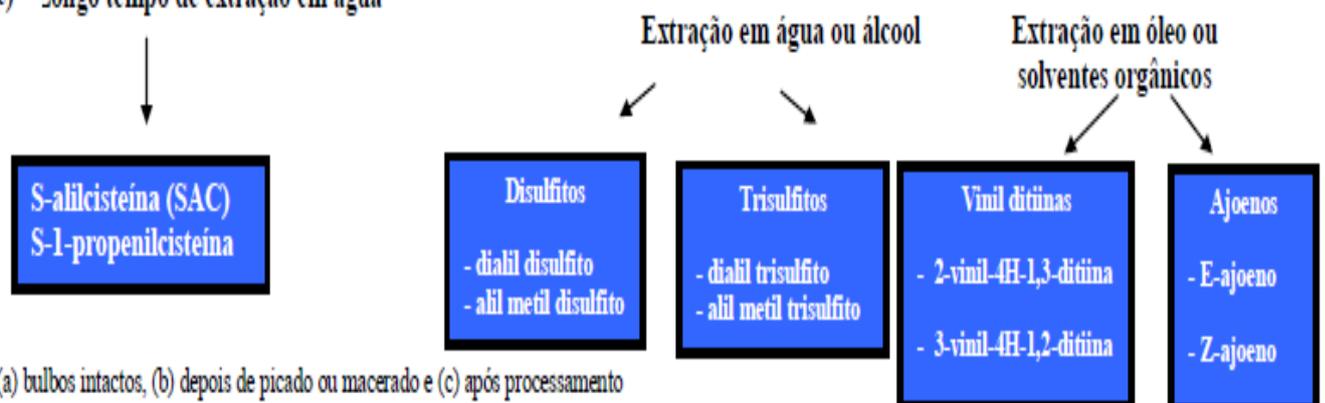
a) Durante o plantio, a germinação e armazenamento dos bulbos intactos



b) Picado ou macerado



c) Longo tempo de extração em água



(a) bulbos intactos, (b) depois de picado ou macerado e (c) após processamento

Fonte: HOLUB 2002

**Figura 4:** Reações químicas dos principais compostos organosulfurados encontrados no alho (HOLUB et al., 2002 p. 205)

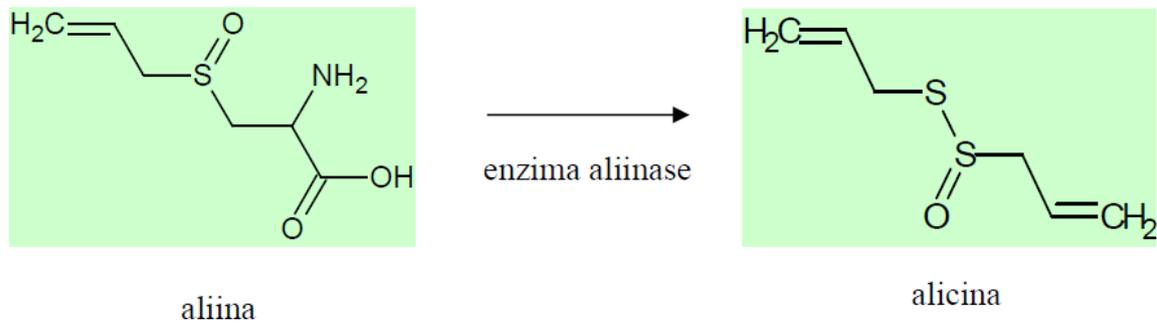
### 3.2.2. Compostos organosulfurados em alho fresco picado

O ácido sulfênico intermedia a conversão dos sulfóxidos de cisteína para tiosulfatos, reação essa catalisada pela enzima aliinase liberada quando o alho fresco é mecanicamente picado (LANZOTTI, 2006; BLOCK, 1992), de acordo com a figura 4, item b. A aliinase é mais abundante nos bulbos do que nas folhas, representando mais de 10% do total de proteínas nos bulbos (ELLMORE; FELDBERG, 1994; HOLUB et al., 2002). Sua atividade depende da temperatura e do pH, a faixa de pH para obter melhor atividade é entre pH 5 a 10, sendo que pH 1,5 a 3 causam a desnaturação (KREST; KEUSGEN, 1999).

Quando o alho é picado, macerado ou mastigado, libera tiosulfatos voláteis e reativos que são responsáveis pelo odor característico. O alil-2-propeno tiosulfato, conhecido como alicina é o tiosulfato mais abundante com cerca de 70%, sendo o alil metano tiosulfato o segundo com 18%, existindo ainda formação de outros tiosulfatos em concentrações menores. A transformação de sulfóxidos de cisteína em tiosulfatos em temperatura ambiente ocorre de 0,2 a 0,5 minutos para a alicina e 1,5 a 5,0 minutos para o alil-metil-tiosulfato, sua estabilidade depende da pureza, solvente usado, da concentração e da temperatura na qual ocorre a reação. Sendo a alicina pouco solúvel em água e mais solúvel em solventes orgânicos, principalmente os polares. A vitalidade da alicina em água é de 30 dias e 60 dias em ácido cítrico (LAWSON, 1993; HOLUB et al., 2002).

Várias transformações dependentes de temperatura, pH e condições de solventes ocorrem para que os tiosulfatos se convertam em substâncias estáveis, como os ajoenos, vinil ditiinas, di e trissulfitos (figura 4, item c). A produção de vinil ditiinas e de ajoenos em menores quantidades, ocorrem quando a incubação da alicina ou do alil metano tiosulfato é realizada em solventes de polaridade baixa. No entanto se incubados em água ou álcool formam diferentes produtos como os di e trissulfitos, dependendo da pureza da alicina produz também ajoenos e vinil ditiinas (LANZOTTI, 2006; HOLUB et al., 2002).

Cerca de 70% dos compostos organosulfurados é a alicina, substância produzida pela interação do aminoácido mais abundante no alho, não protéico, a aliina com a enzima aliinase como mostra a figura 5 (OMAR; AL-WABEL, 2010).



**Figura 5** – Formação do composto organosulfurado alicina (OMAR; AL-WABEL, 2010 p. 98).

#### 4. *Staphylococcus aureus*

A bactéria *Staphylococcus* apresenta cocos gram e catalase-positivos, possuem aproximadamente de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, são imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados e são aeróbios ou anaeróbios facultativos. Apresentam-se agrupados em cachos irregulares (*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).

Em 1880, foi descoberta pelo cirurgião Sir Alexander Ogston, possuem coloração amarela, quando cultivado em meios ricos em nutrientes. Por isso em 1884 quando isolou pela primeira vez uma colônia, Rosenbach nomeou de *Staphylococcus aureus* (*aureus* em latim significa dourado) (STARK, 2013).

Podendo crescer em diversos meios, sendo os mais comuns os caldos ou ágar simples, pH = 7, a temperatura ótima de 37°C. Apresentam crescimento também em ágar-sangue e ágar manitol-sal. Também crescem em meios com altas concentrações de NaCl (cloreto de sódio), sendo assim considerados halofílicos. Após 18-24 horas de incubação, são formadas colônias em placa, 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 6 mostra o crescimento de colônias de *S. aureus* em meio telurito-glicina.



**Figura 6** – Colônia *S. aureus* apresenta coloração preta em meio telurito-glicina (In: TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, p. 155).

Está presente na microbiota normal da pele e mucosa de uma grande parte dos mamíferos. Este gênero abrange 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 raça humana é portadora natural desse micro-organismo.

Em conformidade com Stark (2013), o *Staphylococcus aureus* pode se desenvolver de diferentes formas, podendo causar desde infecções simples (espinhas, furúnculos) até graves e potencialmente fatais, tais como pneumonia, meningite, endocardite, artrite séptica, septicemia e outras. 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, sendo essa a principal bactéria causadora de doenças comunitárias e infecções hospitalares (TRABULSI; ARTERTHUM, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005, CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011; SALES; SILVA, 2012).

A transmissão mais comum é de pessoa para pessoa, ocorrendo 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).

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

O estirpe de *S. aureus* possuem resistência à penicilina em maior proporção, chegando a 95% e ainda, 50% apresentam resistência à meticilina, que é uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções por este organismo (LEITE, 2008).

É válido ressaltar que este micro-organismo é capaz de permanecer viável em superfícies por semanas ou até meses (SALES; SILVA, 2012).

## 5. *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* (figura 7) 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). 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).

Conforme Alves (2012), a *E. coli* cresce em temperaturas de 8 a 48°C, mas, sua temperatura ótima é 37°C e seu pH ótimo é entre 6 e 8. Podendo crescer em meios com até 8% de NaCl (MARTINS et al., 2010).



Figura 7– Micrografia de *Escherichia coli* (In: MARTINS, 2010, p. 41).

Theodore Escherich em 1885 observou que a *E. coli* prevalecia na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e que causava doenças quando inoculadas em sítios extra-intestinais. Em 1919 seu nome mudou de *Bacillus coli commune* para *Escherichia coli* em referência ao seu descobridor (BUERIS, 2008).

*E. coli* é uma espécie universal, sendo o ser vivo mais conhecido na face da terra (*E. coli* K12), dividindo-se em dois grandes grupos de amostras em relação com o ser humano. Sendo o primeiro grupo *E. coli* comensal, que são bactérias presentes no intestino humano desde o nascimento até a morte, constituídas por amostras que causam infecções por mecanismos comuns, já o segundo grupo é chamado de *E. coli* patogênica, que são as que causam uma série de infecções entre elas a diarreia, disenteria, colite hemorrágica, infecções de bexiga e rim, pneumonia, entre outras (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; MARTINS, 2010; SAMEGINA, 2008).

A contaminação se dá principalmente por alimentos contaminados pelas fezes, ou seja, 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 (FRANCO, 2002; KASNOWSHI, 2004).

## 6. MEIO DE CULTURA E INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

A experimentação é uma metodologia que visa tornar o ensino de química mais interessante, contribuindo para a aprendizagem científica do aluno. A utilização de substâncias naturais tem sido empregada como uma importante alternativa metodológica para o ensino de química (FONSECA; GONÇALVES, 2004).

Uma vez que a disciplina de química é vista pelos alunos como uma matéria complicada e de alta dificuldade. A disciplina da química no ensino médio baseia-se apenas na teoria, dessa maneira dificulta ainda mais o aprendizado, pois não conseguem assimilar o conteúdo estudado com o seu cotidiano (VEIGA; QUENENHEMM; CARGENIN, 2013).

Visando então cumprir com a relação entre a prática e a teoria, a aplicação do ensino médio por este trabalho sugerida é a de um experimento de extração de uma substância natural e sua utilização no controle de bactérias para complementar as aulas de biologia ou química quando o assunto for micro-organismos, mostrando aos alunos colônias de bactérias cultivadas em meios de cultura caseiros. Podendo ser abordado dentro da química, assuntos diversos como, por exemplo, a utilização de nutrientes (caldo de carne), a fonte de Nitrogênio para o crescimento microbiológico, a gelatinização do amido e a formação de gel na gelatina, entre outros conteúdos quais podem ser explorados pelo professor. Desta forma, o estudante poderá estabelecer uma ligação entre a química orgânica, a microbiologia e o seu cotidiano (GENTILE, 2005).

### 6.1. MATERIAIS

- 1 pacote de gelatina incolor
- 1 xícara de caldo de carne
- Água
- Duas placas de petri (ou duas tampas de margarina ou dois potinhos rasos)
- Cotonetes
- Etiquetas adesivas
- Caneta

- Alho picado

## 6.2. MÉTODO

Dissolver a gelatina incolor na água, conforme instruções do pacote. Misturar ao caldo de carne e colocar nas placas de petri para formar o meio de cultura. No mesmo dia, pegar o alho picado e deixar descansando dentro de uma garrafa com água para preparar o extrato.

Com os meios de culturas prontos, os alunos são orientados a passar o cotonete no chão ou entre os dentes, ou ainda nos celulares. Há ainda outras opções, como usar um dedo sujo ou uma nota de dinheiro. Após o procedimento, esfregar o cotonete levemente sobre o meio de cultura para contaminá-lo e pingar algumas gotas do extrato de alho sobre a região. Tampar as placas de petri ou envolva as tampas de margarina com filme plástico. Marcar nas etiquetas adesivas que tipo de contaminação foi feita. Depois de três dias, observar as alterações nas placas.

Explicação: Ao encontrar um ambiente capaz de fornecer nutrientes e condições para o desenvolvimento, os micro-organismos se instalam e aparecem. Esse ambiente pode ser alimentos mal-embalados ou guardados em local inadequado. O mesmo acontece com o nosso organismo: sem as medidas básicas de higiene, ele torna-se um excelente anfitrião para bactérias e fungos. A utilização do extrato de alho vai demonstrar sua ação antimicrobiana.

## 7. MATERIAIS E MÉTODOS

### 7.1. MATERIAIS

- Erlenmeyer;
- Pinça;
- Placa de petri;
- Pipeta 1 mL;
- Becker de 500 mL;
- Tubo de ensaio;
- Papel de filtro nº 1;
- Proveta de 100 mL;
- Bico de Bunsen;
- Balão Volumétrico de 500 mL

#### 7.1.1. Equipamentos

- Balança semi-analítica (Radwag WTB 300);
- Centrífuga - Celm – 3458;
- Estufa bacteriológica MA32 (MARCONI);
- Capela para plaqueamento (fluxo laminar) - Série 1341 - TROX;
- Auto-Clave Vertical – Phoenix - AV-30;
- Balança semi-analítica (Radwag WTB 300);
- Agitador de tubos Ap-56 (Phoemix);
- Agitador magnético Q.261.2 (Quinis);
- Ultrassonificador 1400 (Thornton);
- Espectrofotometro UV-Vis modelo UV-1650 (Shimadzu) com célula de quartzo de 10nm termostatzada.

### 7.1.2. Reagentes e meios de cultivo

- Agar Brain Heart Infusion (KASVI) (Lote: 072016526);
- TSB (Trypticase soy broth) (ACUMEDIA) (Lote: 100,671 A);
- Etanol P.A; (CAAL produtos químicos LTDA);
- Metanol P.A; (CAAL produtos químicos LTDA);
- Reagente de Folin-Ciocalteu; (Sigma- Aldrid Co.);
- Ácido Gálico; (Sigma- Aldrid Co.);
- Ácido pirúvico, (Sigma- Aldrid Co.);
- 2,4-dinitrofenildrazina (DNPH) (Sigma- Aldrid Co.);
- Ácido clorídrico P.A. (Labsynth Produtos para Laboratórios LTDA);
- Hidróxido de sódio P.A. (Labsynth Produtos para Laboratórios LTDA);
- Água destilada;

### 7.1.3. Micro-organismos

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

### 7.1.4. Amostra

Os bulbos de alho foram comprados em um estabelecimento comercial na cidade de Tarumã/SP.

## 7.2. MÉTODOS

### 7.2.1. Extração dos compostos fenólicos do alho

O processo de extração de substâncias pode ocorrer de muitas maneiras, variando tanto o tipo de solvente quanto a metodologia. Por isso, no presente trabalho foram utilizados três solventes diferentes para a obtenção dos extratos de alho. A metodologia adotada foi descrita por NUUTILA et al. (2003) com modificações, onde foi realizada com os solventes, etanol, água destilada e metanol/água (70:30 v/v). Foram pesados 3 g de amostra e adicionado 20 mL do solvente. A amostra foi agitada (temperatura ambiente) por 1 hora em agitador magnético e ultrassonificada por 20 minutos, centrifugada por 20 minutos a 936 x g e em seguida filtrada, utilizando papel filtro. O sobrenadante foi armazenado em balão volumétrico de 50 mL. O resíduo retido no filtro sofreu nova extração, sendo que seu sobrenadante foi direcionado para o mesmo balão. 10 mL de solvente foram utilizados para lavagem final do resíduo, sendo este descartado. Os sobrenadantes foram completados para o volume de 50 mL com os respectivos solventes. Todos os extratos obtidos foram colocados em frascos âmbar, e utilizados logo após o procedimento.

### 7.2.2. Determinação de compostos bioativos

#### 7.2.2.1. Determinação de compostos fenólicos totais

Foi realizado o método desenvolvido por SINGLETON e ROSSI (1965) modificado por NUUTILA et al. (2003) empregando o reagente de Folin-Ciocalteu, para obtenção do teor de compostos fenólicos nas amostras. Este método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina e é o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 735 nm. Em tubos de ensaios, foram adicionados 400 µL do extrato, 400 µL de metanol, 400 µL de Folin-Ciocalteu e 2000 µL da solução de carbonato

de sódio (20% m/v). Esta mistura foi homogeneizada em agitador de tubos, sendo adicionados 800 µL da solução de carbonato de sódio (20% m/v). Depois centrifugadas por 3 minutos a 20000 x g e mantidas em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 735 nm, utilizando-se espectrofotômetro. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado através da elaboração da curva padrão do ácido gálico em seis concentrações diferentes (0,005 a 0,03 mg/mL).

Os valores obtidos foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100g de amostra em base seca (mg EAG/100g).

#### 7.2.2.2. Determinação de compostos organosulfurados (alicina)

A alicina é estimada pela mensuração da atividade enzimática que determina a concentração de ácido pirúvico. O método é baseado na reação da aliina-alinase a qual produz uma molécula de alicina e duas moléculas de ácido pirúvico. Para obtenção do extrato, 1 g de alho foi extraído com 20 mL de solvente, etanol, água destilada e metanol/água (70:30 v/v) a 25°C por 10 minutos em agitador magnético em seguida a amostra foi deixada em repouso por 15 minutos e filtrada (LAGUNAS; CASTAIGNE, 2008). Depois a alicina nas amostras de alho foi determinada segundo o proposto por SCHIWIMMER; WESTON (1961), onde foi colocado em tubos de ensaio 1 mL do extrato, 1 mL de 0,0125% de 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) em HCl (2N), 1 mL de água destilada e agitados. Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria a 37°C durante 10 minutos, depois foi adicionado 5 mL de NaOH 0,6 N, foram agitados e deixados por 5 minutos para desenvolver a cor amarela. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 420 nm. O ácido pirúvico (AP) foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em micromoles de ácido pirúvico por grama de alho em base úmida (µmol AP/g).

#### 7.2.3. 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 foi feita a diluição até a obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  micro-organismos m.L-1).

#### **7.2.4. Preparo dos meios de cultivo**

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

#### **7.2.5. Plaqueamento**

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

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 TSB solidificado e com uma alça de Drigaski, previamente flambada, foram espalhados nas placas.

#### **7.2.6. Antibiograma**

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

Com as placas já inoculadas, os discos de papel de filtro, com 4 mm de diâmetro, foram impregnados individualmente com 20 µL de extrato de alho (compostos bioativos), sendo colocados em cada placa com o auxílio de uma pinça. O teste foi feito em triplicata. Em seguida as placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Depois foi realizada a medição dos halos de inibição do crescimento bacteriano.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cálculo do teor de fenólicos foi realizado através da elaboração da curva analítica do ácido gálico (figura 8) em seis concentrações diferentes (0,005 a 0,03 mg/mL), da qual se obteve a seguinte equação:

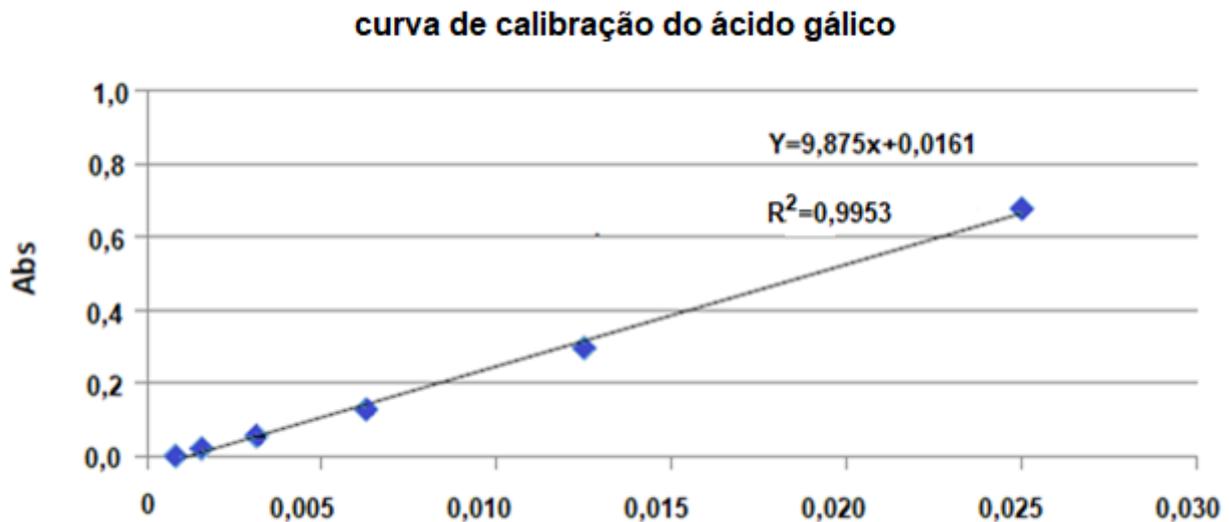
$$Y = 9,875x + 0,0161 \quad (R^2 = 0,9953)$$

Onde y= valor da absorbância

X= teor de fenólicos totais

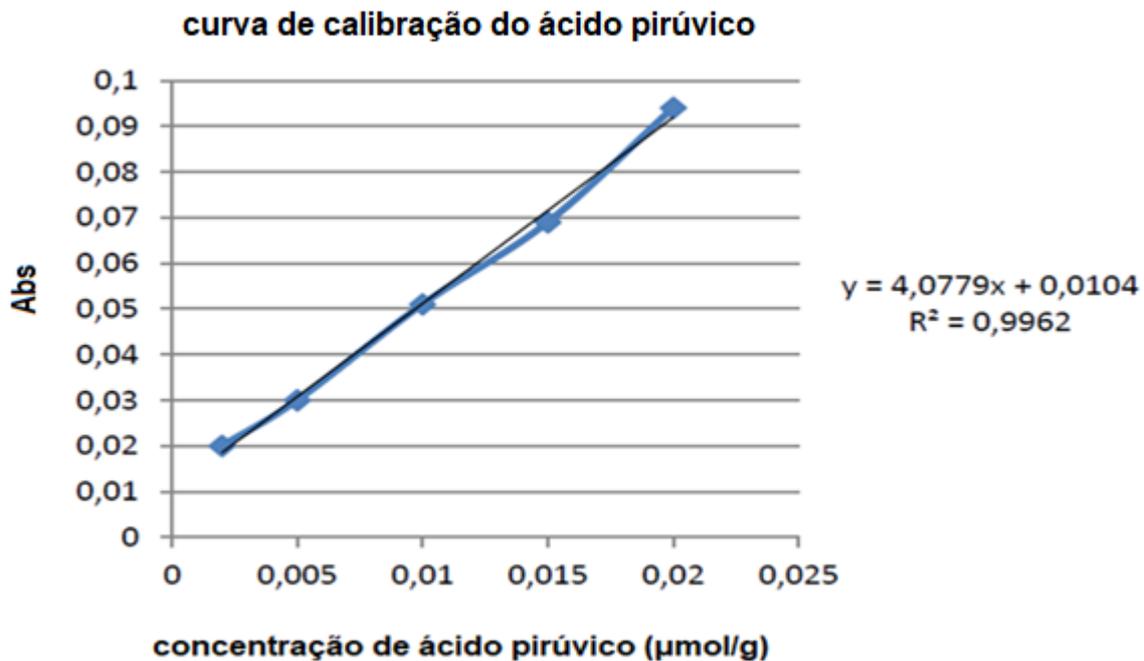
R<sup>2</sup>= coeficiente de determinação do modelo.

Os valores obtidos foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por 100g de amostra em base seca (mg EAG/100g).



**Figura 8** - Curva de calibração do Ácido Gálico utilizada na determinação dos compostos fenólicos.

O cálculo do teor de compostos organosulfurados foi realizado através da elaboração da curva analítica do ácido pirúvico, figura 9.



**Figura 9** - Curva de calibração do Ácido Pirúvico utilizada na determinação dos compostos organosulfurados.

O teor de fenólicos totais e o teor de compostos organosulfurados (alicina) das amostras estudadas foram determinados, dos quais os resultados obtidos indicaram que o alho “in natura” contém compostos fenólicos e organosulfurados entre seus constituintes. Os cálculos foram realizados utilizando a equação da reta ajustada. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

SOLVENTES	TEOR DE FENOLICOS TOTAIS (mg EAG/100g)
Aquoso	177,00 ± 13,49
Etanol	14,52 ± 0,76
Metanol/água (70:30 v/v)	68,07 ± 1,80

**Tabela 2** – Teor de fenólicos totais (média ± desvio padrão), em alho fresco, dos extratos de alho.

SOLVENTE	TEOR DE ORGANOSULFURADOS ( $\mu\text{mol AP/g}$ )
Aquoso	85,10 ± 5,62
Etanol	7,26 ± 1,02
Metanol/água (70:30 v/v)	36,62 ± 0,87

**Tabela 3** – Teor de organosulfurados (alicina)(média ± desvio padrão), em alho fresco, dos extratos de alho.

NUUTILA et al. (2003) relataram que o alho “in natura” liofilizado, contém 11,5 mg EAG/100 g de compostos fenólicos. Já GORINSTEIN et al. (2009) encontrou 900 e 636 mg EAG/100g destes compostos nos extratos metanólico e metanol/água (1:1 v/v), respectivamente. Neste estudo, os teores de fenólicos totais por 100 g de alho “in natura” variaram com o tipo de solvente, em extrato aquoso, etanólico e metanol/água, foram respectivamente 177, 14,52 e 68,07 mg EAG/100 g de alho (tabela 2), valor maior que o achado por NUUTILA (2003), uma vez que a amostra do presente estudo é “in natura” enquanto que a do autor citado é liofilizada, porém menor do que o estudo de GORINSTEIN et al. (2009) em extrato metanólico. As diferenças de resultados pode-se justificar pelas diferentes condições climáticas, solo, variedade botânica, técnicas de manuseio, armazenamento pós-colheita ou o tratamento térmico da liofilização, que podem influenciar a composição química, segundo RIOS e PENTEADO (2003).

A tabela 4 apresenta os valores encontrados na literatura, não somente para alho, mas para outros trabalhos que determinaram compostos fenólicos em extratos vegetais.

REFERÊNCIA	AMOSTRAS	SOLVENTES	TEOR DE FENOLICOS TOTAIS mg EAG/100g
<b>RESULTADOS</b>	Alho in natura	Aquoso	177,00 ± 13,49
<b>RESULTADOS</b>	Alho in natura	Etanol	14,52 ± 0,76
<b>RESULTADOS</b>	Alho in natura	Metanol/água (70:30 v/v)	68,07 ± 1,80
<b>NUUTILA et al. (2003)</b>	Alho in natura liofilizado	Metanol	11,5
<b>GORINSTEIN et al. (2009)</b>	Alho in natura	Metanol	900
<b>GORINSTEIN et al. (2009)</b>	Alho in natura	Metanol/água	636
<b>BENKEBLIA (2005)</b>	Alho in natura	Aquoso	49*

Tabela 4 – Valores de compostos fenólicos encontrados na literatura. \* mg/EAC/100g

BENKEBLIA (2005) estudando alguns extratos de cebola e de alho também verificou que o alho “in natura” possui elevado teor de fenólicos totais (49 mg/100 g em equivalente de ácido clorogênico).

Em comparação ao estudo realizado para extração e determinação de compostos fenólicos de BENKEBLIA (2005), que obteve valor inferior aos encontrados neste trabalho, comprovam que os extratos aquoso, etanólico e metanol/água (70:30 v/v) do alho, obtidos

neste estudo, apresentaram melhor extração e conseqüente, maior quantidade de compostos fenólicos que o apresentado por ele.

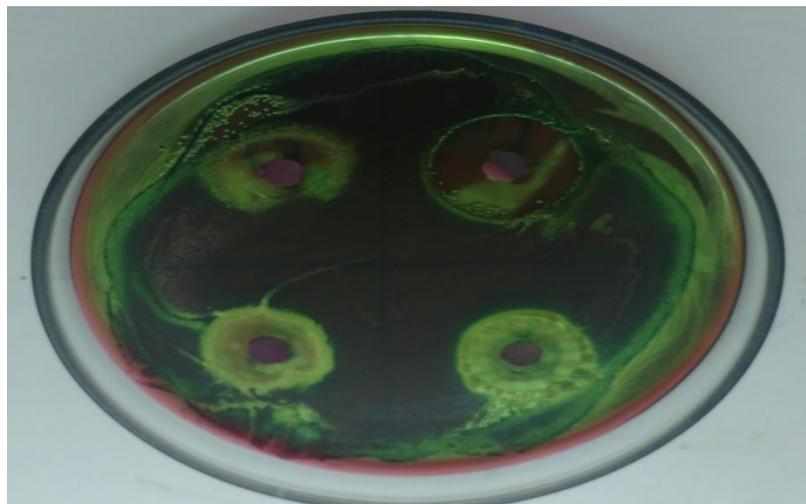
A tabela 5 mostra o resultado médio dos halos de inibição obtidos nos antibiogramas.

BACTÉRIA	HALO DE INIBIÇÃO (mm)		
	ÁGUA	ETANOL	METANOL / ÁGUA (70:30 V/V)
<i>Escherichia coli</i>	17	14	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	15	18

**Tabela 5** - Resultados da atividade bacteriana dos extratos sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O teste de antibiograma realizado constatou que os extratos de compostos bioativos do alho apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, visto que o halo de inibição foi superior a 8 mm.

A figura 8 mostra o crescimento da bactéria *E. coli* no meio EMB com discos impregnados com 20 µL de extratos em etanol, água destilada, metanol/água (70:30 v/v), respectivamente, utilizando a técnica em superfície. Neste teste houve a formação do halo de inibição ao redor dos discos com a medida de 14, 17 e 16 mm respectivamente.



**Figura 10** – Crescimento da bactéria *E. coli* em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo extratos de alho em água (direita em cima) , etanol (direita em baixo) e metanol/água (esquerda).

A figura 11 mostra o crescimento da bactéria *S. aureus* no meio BHI com discos impregnados com 20  $\mu$ L de extratos em etanol, água destilada, metanol/água (70:30 v/v), utilizando a técnica em superfície. Neste teste houve a formação do halo de inibição ao redor dos discos com a medida de 15, 22 e 18 mm respectivamente.



**Figura 11** – Crescimento da bactéria *S. aureus* em superfície apresentando halo inibitório ao redor do disco contendo extratos de alho em água (direita em cima), etanol (direta em baixo e esquerda em baixo) e metanol/água (esquerda em cima).

O halo inibitório considerado foi à área sem crescimento detectável a olho nu. Através desta observação foi possível observar que na quantidade de 20  $\mu$ L houve inibição, uma vez que houve a formação de halo ao redor do disco. Segundo os parâmetros apresentados na tabela 6, a bactéria *S. aureus* mostrou ser extremamente sensíveis (+++) em extrato aquoso e muito sensível (++) em extratos etanólico e metanol/água (70:30 v/v) frente ao compostos bioativos do alho e a bactéria *E. coli* mostrou ser muito sensíveis (++) em extrato aquoso e metanol/água (70:30 v/v) e sensível (+) em extrato etanólico frente ao compostos bioativos do alho.

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

**Tabela 6** – Classificação dos padrões de sensibilidade (MOREIRA et. al, 2005, p. 566).

No estudo feito por MILANI (2016), o extrato de alho, mostrou ser extremamente sensíveis (+++), porém, foi utilizado o extrato bruto de 15 bulbos de alho, o que justifica os valores de halos superiores encontrados para *E. coli* (28 mm) e *S. aureus* (20 mm), pois, os extratos brutos possuem maior concentração de compostos biativos. Neste trabalho foi utilizado quantidade menor de alho e extratos diluídos, obtendo halo de inibição igual ou superior em extrato aquoso, comprovando a eficácia dos extratos produzidos a partir de 3 gramas de alho “in natura”.

RODELLA (2015), estudando a atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia, constatou que as duas bactérias testadas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* se mostraram sensíveis frente à concentração do óleo extraído, pois obteve formação de halos de 14 mm. Neste trabalho os extratos aquosos obtiveram formação de halos de 17 mm e 22 mm frente a *E. coli* e *S. aureus* respectivamente. Portanto, o extrato aquoso do alho se mostrou mais eficaz que o óleo essencial do cravo-da-índia.

Os resultados obtidos neste estudo reafirmam a hipótese de que os compostos bioativos do alho “in natura” são potencialmente benéficos à saúde, uma vez que foi demonstrado o seu teor de compostos fenólicos e organosulfurados e o poder de inibir a atividade bacteriana das bactérias *E. coli* e *S. aureus*, ainda que alguns extratos tenham apresentado melhor eficácia.

Contudo, vale ressaltar que resultados obtidos em experimentos *in vitro* nem sempre são reproduzidos *in vivo*, portanto não necessariamente o consumo de alho irá reproduzir o mesmo efeito no organismo.

## 9. CONCLUSÃO

A água foi o solvente que melhor extraiu compostos bioativos do alho, quando comparado com etanol e metanol/água (70:30 v/v).

Os resultados médios dos teores de fenólicos totais por 100 g de alho “in natura” variaram com o tipo de solvente, em extrato aquoso, etanólico e metanol/água, foram respectivamente 177, 14,52 e 68,07 mg EAG/100 g de alho e o teor de compostos organosulfurados (alicina) foi de 85,10, 7,26 e 36,62  $\mu\text{mol AP/g}$  em extrato aquoso, etanólico e metanol/água respectivamente.

Os resultados corroboram com o esperado e sugerem que o alho contribui com benefícios para a saúde, haja visto que este produto apresentou considerável teor de compostos fenólicos e organosulfurados, ambos envolvendo em mecanismos de proteção à saúde.

Os resultados obtidos mostram que a bactéria testada *Staphylococcus aureus* mostrou ser extremamente sensíveis em extrato aquoso com valor médio dos halos de inibição de 22 mm e muito sensível em extratos etanólico e metanol/água (70:30 v/v) com valor médio de inibição de 15 e 18 mm, respectivamente frente ao compostos bioativos do alho e a bactéria *Escherichia coli* mostrou ser muito sensíveis em extrato aquoso e metanol/água (70:30 v/v) com valores médios dos halos de inibição de 17 e 16 mm e sensível com valor médio dos halos de inibição de 14 mm em extrato etanólico frente à concentração do extrato de compostos bioativos do alho empregado.

## REFERÊNCIAS

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

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) – **Resistência Microbiana – Mecanismo e impacto clínico**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo3/gramp\\_staphylo.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm)>. Acesso em: 28 ago. 2016.

ALMEIDA. M. BONAVENTURA, C.; LIMA, A. D.; AZAR, L. **ALHO**. Tecnologia em Gastronomia: Noções de Nutrição. 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.

ANAPA, 2009. Disponível em: <http://www.anapa.com.br/principal/index.php/propriedades-do-alho/95-o-alho-na-fitoterapia>. Acessado em 28/08/2016.

ASCENÇÃO, V. L.; FILHO, V. E. M., Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial. In **XXIV Encontro do SEMIC**, 2013, São Luís. Cad. Pesq., São Luís, v. 20, n. especial, julho 2013.

AYALA, C. O., **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.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M.M.; ARÊAS, J.A.G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BATATINHA, M. J. M.; BOTURA, M. B.; SANTOS, M. M., Efeitos do suco de alho (*Allium Sativum* L.) em Caninos infectados com Nematódeos Gastrointestinais: Aspectos Clínicos. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**. v. 27. 2005.

BENKLEBIA N. Capacidade de eliminação de radicais livres e propriedades antioxidantes de algumas cebolas selecionadas (*Allium cepa* L.) e extratos de alho (*Allium sativum* L.). **Arco do Brasil de Biol e Techn**; vol. 45: p.753-759, 2005.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B.; Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste brasileiro. **Infarma**, Vol. 17, nº. 3/4, p. 80-83, 2005.

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

BLOCK, E., A química organosulfurada do gênero *Allium* - implicações para o Química orgânica do enxofre. **Angew Chem In E Engl**, 31: 1135-78,1992.

BONTEMPO, M. Alho, sabor e saúde. São Paulo: **Alaúde Editorial**. São Paulo, p. 152, 2007.

BOREK, C. **Efeitos antioxidantes para a saúde da idade, extrato de alho**. **Nutrição**, v. 131, p. 101 – 155, 2001.

BRAVO, L. **Polifenóis: química, fontes alimentares, metabolismo e significado nutricional**. **Análises nutricionais**, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

BUERIS, V.; **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.

CAMARGO, C. D.; BARREIRA, P. **Alho: uma planta mágica com um futuro garantido no mercado nacional**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 98 p, 1985.

CARDOZO, K.H.M.; GUARATIM, T.; BARROS, M.P.; FALÇÃO, V.R.; TONOM, A.P.; LOPES N. **Metabolitos secundários e impacto econômico - phenolic compound - Toxicol Pharmacol**, v. 3, p. 78- 128, 2007.

CHAPAVAL, L.; AGUIAR, V. M. P.; SOUSA, A. P. B.; MIRANDA, K. P.; MORORÓ, A. M.; MAGALHÃES, D. C. T.; **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: 28 ago. 2016.

CHARLAB, S. et. al. A cura pela comida. **Reader's Digest Brasil Ltda**, Rio de Janeiro, 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4<sup>a</sup>.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

COSTA, C. D. R. S.; **Importância de *Staphylococcus* spp. Produtores de enterotoxinas em alimentos**. 2008. 34 p. Pós-graduação (Monografia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

COZZOLINO, S.M.F.; COMINETTI, C. **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. 1 ed. Barueri, SP: Manole, p.1257, 2013.

CRAVEIRO, A. A.; DE QUEIROZ, D. C.; Óleos essenciais e química fina. **Revista Química Nova**, Vol. 16, n. 03, p.224-228,1993.

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, p. 1-11, 2011.

CRUZ, E. D. A.; ***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, H. F.; **Formação de biofilme por *Escherichia coli* enteropatogênica atípica**. 2010. 32p. Dissertação (mestrado) – Departamento de Biotecnologia- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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., p.467-477, 2014.

EGEN-SCHWIND, C.; ECKARD, R.; KEMPER, F.H. DIMITRIOS, B.; **Metabolismo dos constituintes do alho no fígado de rato perfundido isolado**. *Planta Med*, v. 58, p. 301–305, 1992.

ELLMORE, G. S.; FELDBERG; R. S., **Alliinylase localixation in the bundle sheats of the garlic clove (*Allium sativum*)**. *Am J Bot*; 81: p.89-94, 1994.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B., 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. p.224-230, 2007.

FENWICK, G. R., HARLEY, A. B. Genus *Allium*, Part. 1. **Revista Food Sci. Nutri**. V. 2, nº 22, p. 199-274, 1985.

FONSECA, S. F.; GONÇALVES, C. C. S. Extração de pigmentos do espinafre e separação em coluna de açúcar comercial. **Química Nova na Escola**, v. 20, p. 55-58, 2004.

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

GENTILE, P., É assim que se aprende. **Nova Escola**. n. 179, Jan/Fev. 2005

GODINHO, G. C., **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.

GORINSTEIN, S.; JASTRZEBSKI, Z.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; NAMIESNIK, J. NAJMAN, K., **Comparative control of the bioactivity of some frequently consumed vegetables subjected to different processing conditions** **Food Contr**, ed. 4, p. 407-413, 2009.

HAGERMAN, A. E; ZHAO, Y; JOHNSON, S. E; SHAHADI, F. Métodos para a determinação de taninos condensados e hidrolisáveis. **Acs Sym Ser**, v. 662, p. 209-222, 1997.

HOLUB, B. J; SINGH, D. K; COTTRELL, S. L; PLUMMER, S., Compostos organossulfurados do alho. **Alimentos funcionais: aspectos bioquímicos e processamento**. Washington: CRC, cap.7, p.213-238, 2002.

HORST M. A.; MORENO, F. S. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: **Avaliações nutricionais**, v. 56, p. 317-333, 1998.

KASNOWSHI, M. C.; ***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.

KAUR C.; KAPOOR H.C.; Antioxidantes em frutas e vegetais - a saúde do milênio. **Int J Food Sci e Techn**; vol, 36; p. 703-25, 2001.

KREST, I.; KEUSGEN, M., **Quality of herbal remedies from *Allium sativum*; differences between garlic power and fresh garlic.** **Plant Med**, 65(2) p.139-43,1999.

KRIS-ETHERTON, P. M; EAGLING, D.; STERLING, S.; HANNUM, S. M. **Compostos bioativos em metodologias de nutrição e pesquisa de saúde para o estabelecimento da função biológica: os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos flavonóides na aterosclerose.** **Avaliações Anuais de Nutrição**, Califórnia, v.24, p.511-538, 2004.

LAGUNAS, L. L. M.; CASTAIGNE, F., **Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic.** **Food Chem**, v.11, p. 56-60, 2008.

LANZOTTI, V. **Análise de cebola e alho.** **Chromatography A**, v.2, p.3-22, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305024064>>. Acesso em: 20 maio, 2017.

LAWSON, L. D., Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: Role in reducing blood lipids. In: Human Medicinal Agents from Plants. American Chemical Society, Washigton, p. 306-30, 1993.

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, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L.; Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 16(2), Abr./Jun. p. 197-201, 2006.

LIMA, M. A.; TEIXEIRA, L. N.; SOUSA, P. B. S.; SILVA, M. J. M. S.; CARVALHO, L. F. M.; **DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA PIMENTA DEDO-DE-MOÇA (*Capsicum baccatum* var. *pedulum*).** 2012, 53p. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Tecnólogo em Alimentos). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, Teresina, 2012.

MAIA, T. F.; DONATO, A.; FRAGA, M. E.; Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Plantas, **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, V. 17, nº 1, p. 105-116, 2015.

MARTINS, A. G. L. A.; NASCIMENTO, A. R.; FILHO, J. E. M.; FILHO, N. E. M.; SOUZA, A. G.; ARAGÃO, N. E.; SILVA, D. S. V.; 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, p.1791-1796, 2010.

MIEAN, K. H.; MOHAMED, S.; Flavonoides (Miricetina, Quercetina, Luteolina e Apigenina) Conteúdo de Plantas Tropicais Comestíveis. **Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 106-112, 2001.

MILANI, H. L. A.; TEIXEIRA, A. X. V.; SOUSA, E. C.; ABREU, V. A.; NINAHUAMAN, M.F.M.L.; **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do alho (*Allium sativum*) "in natura"**. 2016. 58p. Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Farmacologia - Centro Universitário Adventista de Sao Paulo (Unasp-SP), São Paulo, 2016.

MILLER H. E, RIGELHOF F, MARQUART L, PRAKASH A, KANTER M. Conteúdo antioxidante de cereais de pequeno-almoço integral, frutas e vegetais. **J American College Nutr**; vol.19; p. 1-8, 2000.

MORAIS, S. M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L.; Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do brasil. **Quimica Nova**. Vol. 29, No. 5, p. 907-910, 2006.

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, p. 565-570, 2005.

MOTA, H. B.; KESKE-SOARES, M.; FERLA, A.; ZASSO, L. V.; DUTRA, L. V. Estudo comparativo da generalização em três modelos de terapia para desvios fonológicos. **Saúde**, Santa Maria, v. 28, n. 1 e n. 2, p. 36-47, jan.-dez. 2002.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C.; Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 17 n°1, Jan./Mar. p. 108-113, 2007.

NUUTILA, A. M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M., **Comparação de atividades antioxidantes de extratos de cebola e alho pela inibição da peroxidação lipídica e da atividade de eliminação de radicais**. v. 81, p. 485-493, 2003.

OLIVEIRA, F. L. de; MANHAES S. S., **Estabelecimento de leguminosas forrageiras tropicais na sombra**. **Pasturas Tropicais**, v. 25, n°3, p. 13-17, 2003.

OLIVEIRA, N. J. F. de; MELO, M. M. Consumo de leguminosa. **Revista Vegetariana**, Uberlândia, v.10 n°1, p. 111-120, 2004.

OMAR, S. H.; AL-WABEL, N. A. Compostos de organossulfurados e possível ação do alho contra o câncer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 51–58, 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, p. 137-143, 2009.

RIOS M. G., PENTEADO M. V. C.; Determinação de q-tocoferolem alho irradiado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova** vol. 26, p.10-12, 2003.

RODELLA, F. M.;; **EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA**, 2015, 80p Trabalho de conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA, 2015.

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

SAMEGIMA, D. A. G., **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, p. 413-423, 2007.

SANTOS, D.; **Testes de genética molecular**, PUC-RS – disponível em <https://djalmasantos.wordpress.com/2011/07/10/testes-de-genetica-molecular-45/>. Acesso em: 20 de Jun. 2017.

SCHIWIMMER, S.; WESTON, W. J., **Enzymatic development of pyruvic acid in onion as a measure of pungency**. **J Agric Food Chem**, v. 9 ed. 4, p. 301-304.

SERAFIM, R. A.; **Quantificação de compostos fenólicos e avaliação da ação antioxidante de extratos aquosos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2013, 34p. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Tecnólogo em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Londrina, 2013.

SILVA, J. A.; SILVA, W. D.; *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Escherichia coli* COMENSAL, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Revista UFG**, v. 34, nº. 3, set-dez, p.175-196, 2005.

SILVESTRI, J. D. F.; PAROUL, N.; CZYEWski, E.; LERIN, L.; ROTAVA, I.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; TONIAZZO, G.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; 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, p. 589-594, 2010.

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.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, Jr. J. A., **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagentes**. **Am J Emol Vitic**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUSA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R., Óleos essenciais: aspectos sustentáveis. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, V.6, nº.10, 2009.

STARK, L.; **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.

TACO tabela brasileira de composição de alimentos 2ª ed., 2006. Disponível em: <http://www.taco.com.br/principal/index.php /tabela-brasileira-de-composicao-de-alimentos-4a-edicao>. Acessado em 23/03/2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. 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.

VEIGA, M. S. M.; QUENENHEMM, A.; CARGENIN, C.; **O Ensino de química: algumas reflexões**. Londrina, 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/eventos/jornadadidatica/pages/arquivos/O%20ENSINO%20DE%20QUIMICA.pdf>>. Acesso em: 22 de ago, 2016.

VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; Uso de plantas medicinais. **Revista Arquivos FOG – Saúde, Sociedade, Gestão e Meio Ambiente**, vol. 5, p. 33-41, 2008.