

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LUIZA TOUBAS CHAUL

**Caracterização e Determinação da Atividade Antimicrobiana dos
Extratos Brutos e Frações de *Rosmarinus officinalis* Linn.
(alecrim), *Origanum vulgare* Linn. (orégano) e *Capsicum chinense*
Jacq. (pimenta habanero)**

Goiânia

2015

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Luiza Toubas Chaul		
E-mail:	luizachaul@hotmail.com	luizachaul@gmail.com	
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	"Caracterização e determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações de <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn. (alecrim), <i>Origanum vulgare</i> Linn. (orégano) e <i>Capsicum chinense</i> Jacq. (pimenta habanero)".		
Palavras-chave:	Concentração Inibitória Mínima. Frações. Ácido Rosmarínico. <i>Rosmarinus officinalis</i> . <i>Origanum vulgare</i> . Capsaicina. <i>Capsicum chinense</i> .		
Título em outra língua:	"Characterization and determination of antimicrobial activity of extracts and fractions of <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn. (rosemary), <i>Origanum vulgare</i> Linn. (oregano) and <i>Capsicum chinense</i> Jacq. (habanero pepper)".		
Palavras-chave em outra língua:	Minimum Inhibitory Concentration. Fractions. Rosmarinic acid. <i>Rosmarinus officinalis</i> . <i>Origanum vulgare</i> . Capsaicin. <i>Capsicum chinense</i> .		
Área de concentração:	Fármacos e Medicamentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	27 de fevereiro de 2015		
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Farmacêuticas		
Orientador:	Prof. Dr. José Realino de Paula		
E-mail:	jrpaula@gmail.com		
Co-orientador:	Prof. Dra. Virginia Farias Alves/ Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição		
E-mail:	valves.ufg@gmail.com/ ecardosoufg@gmail.com		

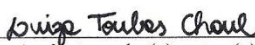
*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.



 Assinatura do (a) autor (a)

Data: 06 / 04 / 2015

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

LUIZA TOUBAS CHAUL

**Caracterização e Determinação da Atividade Antimicrobiana dos
Extratos Brutos e Frações de *Rosmarinus officinalis* Linn.
(alecrim), *Origanum vulgare* Linn. (orégano) e *Capsicum chinense*
Jacq. (pimenta habanero)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula

**Co-Orientadores: Prof. Dra. Virgínia Farias Alves;
Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição**

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Toubas Chaul, Luiza

“Caracterização e determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações de *Rosmarinus officinalis* Linn. (alecrim), *Origanum vulgare* Linn. (orégano) e *Capsicum chinense* Jacq. (pimenta habanero)”. [manuscrito] / Luiza Toubas Chaul. - 2015. CXXVI, 126 f.

Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula; co-orientadora Dra. Virgínia Farias Alves; co-orientador Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2015.

Bibliografia.

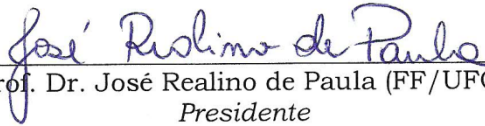
Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Concentração Inibitória Mínima. 2. Plantas Medicinais. 3. Frações. 4. Ácido Rosmarínico. 5. Capsaicina. I. Realino de Paula, José, orient. II. Farias Alves, Virgínia, co-orient. III. Título.

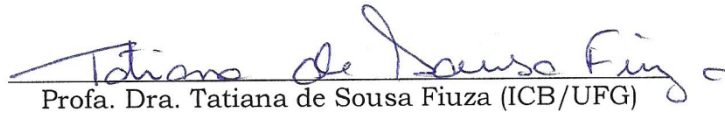
Folha de Aprovação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 27 de fevereiro de 2015, pela mestranda Luíza Toubas Chaul.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)
Presidente



Profa. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza (ICB/UFG)



Profa. Dra. Sandra Ribeiro de Moraes (UNIP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para o êxito deste trabalho. Em todos os momentos do mestrado: experimentos, ensinamentos, escritos e correção. Foi um processo gratificante, contudo, foi necessário um grande esforço, participação, compreensão e apoio de algumas pessoas e/ou instituições para garantir o ganho de conhecimento e gerar um trabalho bem feito. Desta forma agradeço:

Aos meus pais Rômulo Chaul Filho e Maria Voula Toubas, que me ensinaram a virtude da perseverança, paciência e fé. Eles souberam me proporcionar apoio incondicional para a realização deste trabalho, em todos os momentos! Incentivaram-me a continuar a estudar, me deram força e motivação nos momentos mais difíceis.

Aos irmãos, Ulisses Faiad Toubas Chaul e Melina Gregori Toubas, pelo apoio, ajuda e carinho sempre.

À minha avó Eleni Georgios Gregori, pelo amor e carinho inesgotáveis, e pelo exemplo de vida.

Aos avôs Rômulo Chaul (*in memoriam*), Esmeralda Faiad Chaul (*in memoriam*) e Zoé Basile Toubas (*in memoriam*), pela sempre querida lembrança e saudades.

À Leonardo Rios Carneiro, pelo carinho, paciência, apoio e compreensão. Em muitos momentos me ajudou a superar os obstáculos e sempre me apoiou em tudo!

Aos demais familiares, por me encorajarem sempre.

Ao professor Dr. José Realino de Paula, professora Dra. Virgínia Farias Alves e professor Edemilson Cardoso da Conceição, pelos ensinamentos, exemplos e disponibilidade de solucionarem dúvidas e problemas. Obrigada também pelas opiniões e críticas que sempre me impulsionaram a melhorar e aprimorar o conhecimento.

Aos integrantes da banca examinadora: Prof. Dr. José Realino de Paula, Prof. Dra. Tatiana de Sousa Fiuza, Prof. Dra. Sandra Ribeiro de Moraes, Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos, pelas sugestões e considerações, para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFG pelos ensinamentos e gentilezas dedicados.

Aos mestrandos, Carolina de Fátima, Wannessa, Aline, Mythali, Karen, Joelma, Eliane, Elviscley, Jordana e doutorandos, Leonardo, Sandra, Thiago, Stone, Leandra, Rúbia, Cris, Fernanda do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), que com sua paciência, amizade e dedicação nos transmitiram um vasto conhecimento.

Aos alunos de iniciação científica: Aline, Sarah, Leandro, Larissa, Hallana, Adrielle, Aliny, Jaqueline, Danilo Luiz, pela ajuda, amizade e companheirismo.

À professora Dra. Ieda Maria Sapateiro Torres e à responsável técnica do Laboratório de Controle de Qualidade em Medicamentos (LCQM) Nercy Lopes Chaveiro Cardoso por terem gentilmente cedido cepas de micro-organismos, sem as quais não seria possível a conclusão deste trabalho.

À professora Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), que sempre se mostrou disponível para a coleta de sangue de cavalo, extremamente necessária para o experimento.

À professora Dra. Leonice Manrique Faustino Tresvenzol, pela correção do texto e sugestões para a Qualificação.

À professora Dra Maria Teresa Freitas Bara, pela amizade, ensinamentos e exemplo de vida.

À Embrapa Hortaliças, Brasília – DF, que permitiu a doação dos frutos de *Capsicum chinense*.

À todos que participaram, direta ou indiretamente, e estiveram ao meu lado, durante a realização deste trabalho, agradeço.

RESUMO

Nos últimos anos, o interesse por produtos derivados de plantas medicinais que apresentem atividade antimicrobiana tem sido intensificado. O presente estudo buscou caracterizar drogas e extratos vegetais, determinar o teor de polifenóis, taninos, flavonoides, quantificar o marcador escolhido e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos brutos e frações de *Rosmarinus officinalis* Linn., *Origanum vulgare* Linn., e *Capsicum chinense* Jack frente a diferentes micro-organismos (bactérias Gram-positivas e Gram negativas, fungos filamentosos e leveduriformes), patogênicos ou não. As drogas vegetais e os extratos foram obtidos e caracterizados físico-quimicamente de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5. Ed. Os teores de polifenóis, taninos e flavonoides foram calculados. Covalidou-se metodologia para quantificar ácido rosmarínico em *R. officinalis* e *O. vulgare* e validou-se metodologia para quantificar a capsaicina em *C. chinense*. As frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e aquosa foram obtidas por partição a partir do extrato etanólico bruto. Foram realizados testes de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A metodologia para quantificar o ácido rosmarínico, tanto em *R. officinalis*, quanto em *O. vulgare*, e a metodologia para quantificar a capsaicina, foram validadas e apresentam-se aptas a gerar resultados com exatidão e precisão aceitáveis em relação as especificações do FDA e ANVISA. Os teores de ácido rosmarínico encontrados no *R. officinalis* e *O. vulgare* foram de 6,55 e 2,63%, respectivamente. O teor de capsaicina em *C. chinense* foi de 1,84%. Com relação à atividade antimicrobiana, a maioria das frações testadas foram mais ativas que os extratos etanólicos brutos (EEB), sendo que as frações que apresentaram boa atividade frente a um maior número de micro-organismos foram a fração hexânica de *O. vulgare* (OFH) e as frações diclorometânica de *R. officinalis* (AFD) e *C. chinense* (PFD). A maioria das frações testadas apresentou uma atividade inibitória melhor frente a bactérias Gram-positivas do que frente a Gram-negativas. O ácido rosmarínico apresentou boa atividade antimicrobiana principalmente frente a fungos. Frações polares de *O. vulgare* também apresentaram boa atividade antifúngica, podendo o ácido rosmarínico ser considerado um dos possíveis compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana. A capsaicina apresentou atividade inibitória moderada frente a todas as cepas de *Listeria* e pode ser um dos componentes responsáveis pela inibição deste grupo de bactérias. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as frações AFD, OFH e PFD mostram potencial promissor na busca de alternativas naturais para a conservação e o controle de patógenos em alimentos.

Palavras-chave: Concentração Inibitória Mínima. Frações. Ácido Rosmarínico. *Rosmarinus officinalis*. *Origanum vulgare*. Capsaicina. *Capsicum chinense*.

ABSTRACT

In recent years, interest in medicinal products derived from plants that exhibit antimicrobial activity has been intensified. The present study aimed to characterize drugs and herbal extracts, determine the polyphenol content, tannins, flavonoids, quantify the chosen marker and evaluate the antimicrobial activity of crude ethanolic extracts and fractions of *Rosmarinus officinalis* Linn., *Origanum vulgare* Linn. and *Capsicum chinense* Jack. against different microorganisms (Gram negative and Gram-positive bacteria, filamentous fungi and yeasts), pathogenic or not. The herbal drugs and extracts were obtained and physico-chemically characterized according to the Brazilian Pharmacopeia 5. Ed. The polyphenols, tannins and flavonoids contents were evaluated. A methodology to quantify rosmarinic acid from *R. officinalis* and *O. vulgare* was validated and a methodology to quantify capsaicin of *C. chinense* was validated. The fractions hexane, dichloromethane, ethyl acetate and aqueous were obtained by partition. Microdilution broth tests were performed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). It was found that the material is suitable for the study according to the Pharmacopoeias and that there is adequate quality control of the drug plant. Furthermore, the methodology for quantifying rosmarinic acid in both *R. officinalis* and in *O. vulgare* and methodology to quantitate capsaicin, have been validated and it is able to produce results with acceptable accuracy and precision in relation to the specifications of FDA and ANVISA. The content of rosmarinic acid found in *R. officinalis* and *O. vulgare* were 6.55 and 2.63%, respectively. The concentration of capsaicin in *C. chinense* was 1.84%. Regarding antimicrobial activity, most of the tested fractions were more effective than the crude ethanolic extracts (EEB), and the fractions that showed good activity to a greater number of microorganisms were hexane fraction of *O. vulgare* (OFH) and dichloromethanic fraction of *R. officinalis* (AFD) and *C. chinense* (PFD). Most of the tested fractions showed better activity against Gram-positive bacteria than against Gram-negative bacteria. The rosmarinic acid showed antimicrobial activity mainly against fungi. Polar fractions of *O. vulgare* also showed good antifungal activity and rosmarinic acid can be considered one of the possible compounds responsible for the antimicrobial activity. Capsaicin showed moderate activity against all strains of *Listeria* and can be one of the components responsible for moderate inhibition of this group of bacteria. The results of this study suggest that the AFD, OFH and PFD fractions show promising potential in the search for natural alternatives for conservation and control pathogens in food.

Keywords: Minimum Inhibitory Concentration. Fractions. Rosmarinic acid. *Rosmarinus officinalis*. *Origanum vulgare*. Capsaicin. *Capsicum chinense*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Esquema da placa de microtitulação contendo 96 poços em fundo “U”, após as diluições no ensaio de determinação da CIM para bactérias. A concentração inicial é de 2000 µg/mL para bactérias e 1000 µg/mL para fungos. 52
- Figura 2** - Distribuição granulométrica da droga vegetal de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b) e *Capsicum chinense* (c). **Erro! Indicad**
- Figura 3** - Curva padrão de ácido tânico (absorbância em função da concentração de ácido tânico) para a droga vegetal de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* (a); para o extrato líquido concentrado de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* (b); para o extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* (c). **Erro! Indicad**
- Figura 4** - Curva padrão de ácido tânico - absorbância em função da concentração de ácido tânico para doseamento de taninos da droga vegetal, extrato líquido concentrado (ELC) e extrato etanólico bruto (EEB) de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*. **Erro! Indicad**
- Figura 5** - Curva padrão de rutina - absorbância em função da concentração de rutina para doseamento de flavonoides na droga vegetal e extrato líquido concentrado de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* e droga vegetal de *Capsicum chinense* (a); para o extrato líquido concentrado de *Capsicum chinense* (b); para doseamento de flavonoides no extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense* (c). **Erro! Indicad**
- Figura 6** - Perfil cromatográfico – CCD – do padrão de ácido rosmarínico (1), da droga vegetal (2), do extrato líquido concentrado (3) e do extrato etanólico bruto (4) de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b). **Erro! Indicad**
- Figura 7** - Cromatogramas e seus espectros de absorção do padrão de ácido rosmarínico obtidos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) **Erro! Indicad**
- Figura 8** - Cromatogramas e seus espectros de absorção de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b) obtidos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) **Erro! Indicad**
- Figura 9** - Perfil cromatográfico 2D a 329 nm do padrão de ácido rosmarínico (a) e do diluente álcool etílico 80 % (b). **Erro! Indicad**
- Figura 10** - Curva padrão de ácido rosmarínico. **Erro! Indicad**

- Figura 11** - Linearidade do ácido rosmarínico do extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b)..... **Erro! Indica**
- Figura 12** - Cromatogramas e seus espectros de absorção do padrão de capsaicina obtidos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) **Erro! Indica**
- Figura 13** - Cromatogramas e seu espectro de absorção de *Capsicum chinense* obtidos por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) **Erro! Indica**
- Figura 14** - Perfil cromatográfico 2D a 229 nm do padrão de capsaicina (a) e do diluente álcool etílico 86% (b)..... **Erro! Indica**
- Figura 15** - Curva padrão de capsaicina **Erro! Indica**
- Figura 16** - Linearidade da capsaicina do extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense* **Erro! Indica**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Micro-organismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos etanólicos bruto e suas frações, bem como padrão de ácido rosmarínico e capsaicina.50
- Tabela 2** - Classificação da atividade antimicrobiana, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com Holetz et al. (2002); Ayres et al. (2008); Souza et al. (2014).55
- Tabela 3** - Características físico-químicas das drogas vegetais de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense* **Erro! Indica**
- Tabela 4** - Características físico-químicas dos extratos líquidos concentrados de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense* **Erro! Indica**
- Tabela 5** - Rendimento (%) das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e aquosa de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense* **Erro! Indica**
- Tabela 6** - Teor de polifenóis totais, taninos e flavonoides encontrados nas amostras de droga vegetal, extrato líquido concentrado (ELC) e extrato etanólico bruto (EEB) de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense* **Erro! Indica**
- Tabela 7** - Parâmetros de *system suitability* obtidos para os cromatogramas do padrão de ácido rosmarínico e dos extratos etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* **Erro! Indica**
- Tabela 8** - Áreas dos picos do padrão de ácido rosmarínico obtidas para a construção da curva padrão **Erro! Indica**
- Tabela 9** - Repetibilidade do método analítico para doseamento de ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b) **Erro! Indica**
- Tabela 10** - Precisão intermediária do método analítico para doseamento de ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b) **Erro! Indica**
- Tabela 11** - Recuperação do padrão adicionado ao extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* **Erro! Indica**
- Tabela 12** - Recuperação do padrão adicionado ao extrato concentrado de *Origanum vulgare* **Erro! Indica**
- Tabela 13** - Robustez do método para doseamento de ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* (a) e *Origanum vulgare* (b) **Erro! Indica**

- Tabela 14** - Quantificação dos teores de ácido rosmarínico nas drogas vegetais, extrato líquido concentrado e extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*.....**Erro! Indica**
- Tabela 15** - Parâmetros de *system suitability* obtidos para os cromatogramas do padrão de capsaicina e do extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense***Erro! Indica**
- Tabela 16** - Áreas dos picos do padrão de capsaicina obtidas para a construção da curva padrão**Erro! Indica**
- Tabela 17** - Repetibilidade do método analítico para doseamento de capsaicina no extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense***Erro! Indica**
- Tabela 18** - Precisão intermediária do método analítico para doseamento de capsaicina no extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense***Erro! Indica**
- Tabela 19** - Recuperação do padrão adicionado ao extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense***Erro! Indica**
- Tabela 20** - Robustez do método para doseamento de capsaicina no extrato concentrado de *Capsicum chinense*.....**Erro! Indica**
- Tabela 21** - Quantificação do teor de capsaicina no pó e no extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense***Erro! Indica**
- Tabela 22** - Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) do extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* e suas frações frente a micro-organismos.**Erro! Indica**
- Tabela 23** - Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) do extrato etanólico bruto de *Origanum vulgare* e suas frações frente a micro-organismos.**Erro! Indica**
- Tabela 24** - Concentração Inibitória Mínima (CIM em µg/mL) do extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense* e suas frações frente a micro-organismos.**Erro! Indica**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFA -	Fração Aquosa de <i>Rosmarinus officinalis</i>
AFAE -	Fração Acetato de Etila de <i>Rosmarinus officinalis</i>
AFD -	Fração Diclorometano de <i>Rosmarinus officinalis</i>
AFH -	Fração Hexânica de <i>Rosmarinus officinalis</i>
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC -	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI -	<i>Brain Heart Infusion</i>
C -	Valor correspondente à concentração da amostra
CDER -	<i>Center for Drug Evaluation and Research</i>
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI -	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMD -	Concentração Média Determinada
CV -	Coefficiente de Variação
DG -	Distribuição Granulométrica
DP -	Desvio Padrão
DPa -	Desvio padrão do intercepto com o eixo Y de 3 curvas de calibração
DPR -	Desvio Padrão Relativo
DR -	Densidade Relativa
EEB -	Extrato Etanólico Bruto
EEBA -	Extrato Etanólico Bruto de <i>Rosmarinus officinalis</i>
EEBO -	Extrato Etanólico Bruto de <i>Origanum vulgare</i>
EEBP -	Extrato Etanólico Bruto de <i>Capsicum chinense</i>
ELC -	Extrato Líquido Concentrado
FD -	Fator de Diluição
FDA -	<i>Food and Drug Administration</i>
FM -	Fase móvel
FT -	Fator de Cauda
HPLC -	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC -	Inclinação da Curva de Calibração
II -	Índice de Intumescência
IN -	Inativo, com concentração inibitória mínima maior do que 1000 µg/mL.

ISSO -	Isopropanol
LD -	Limite de detecção
LQ -	Limite de quantificação
LSS -	Lauril Sulfato de Sódio
MH -	<i>Mueller Hinton</i>
MHCA -	<i>Mueller Hinton</i> Cátion Ajustado
MOPS -	ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)-propanossulfônico
<i>N</i> -	Número de Pratos Teóricos
OFA -	Fração Aquosa de <i>Origanum vulgare</i>
OFAE -	Fração Acetato de Etila de <i>Origanum vulgare</i>
OFD -	Fração Diclorometano de <i>Origanum vulgare</i>
OFH -	Fração Hexânica de <i>Origanum vulgare</i>
PDA -	Detector de Arranjo Diodos
PdAR -	Padrão de Ácido Rosmarínico
PdC -	Padrão de Capsaicina
PFA -	Fração Aquosa de <i>Capsicum chinense</i>
PFAE -	Fração Acetato de Etila de <i>Capsicum chinense</i>
PFD -	Fração Diclorometano de <i>Capsicum chinense</i>
PFH -	Fração Hexânica de <i>Capsicum chinense</i>
pH -	Potencial hidrogeniônico
<i>r</i> -	Coefficiente de correlação linear
RE -	Resolução da Anvisa
Rf -	Fator de retenção
RPMI -	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS -	Resolução
subsp. -	subespécie
T -	Fator de cauda
TA -	Teor alcoólico
TCT -	Teor de Cinzas Totais
TFT -	Teor de Flavonoides Totais
TPT -	Teor de Polifenóis
TRI -	Trietanolamina
TTC -	Cloreto de trifetil tetrazolium

TTT - Teor de Taninos Totais
TV - Teor de voláteis
UFC - Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	23
2.2 PLANTAS COMO ANTIMICROBIANOS E CONSERVADORES NATURAIS	23
2.3 FAMÍLIA LAMIACEAE	24
2.3.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> Linn.	25
2.3.2 <i>Origanum vulgare</i> Linn.	27
2.4 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS	28
2.5 FAMÍLIA SOLANACEAE.....	28
2.5.1 <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS MATERIAIS VEGETAIS	32
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS DROGAS VEGETAIS.....	32
4.2.1 Determinação do teor de voláteis (TV) e teor de sólidos (TS)	32
4.2.2 Determinação do teor de cinzas totais (TCT)	33
4.2.3 Determinação do índice de intumescência (II)	33
4.2.4 Determinação da distribuição granulométrica (DG)	33
4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	34
4.3.1 Determinação do pH	34
4.3.2 Determinação do teor de voláteis (TV) e teor de sólidos (TS)	34
4.3.3 Determinação da densidade relativa (DR)	35

4.3.4 Determinação do teor alcoólico	35
4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTO (EEB) E DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	35
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS NA DROGA VEGETAL (DV), EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	36
4.5.1 Determinação do teor de polifenóis	36
4.5.2 Determinação do teor de taninos totais	37
4.5.3 Determinação do teor de flavonoides totais	39
4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) DA DROGA VEGETAL (DV), EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i>	41
4.6.1 Preparo das amostras e do padrão	41
4.6.2 Preparo da placa cromatográfica	41
4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	42
4.7.1 Sistema cromatográfico	42
4.7.2 Determinação das condições cromatográficas e <i>system suitability</i> (adequação do sistema)	42
4.7.3 Covalidação da metodologia analítica	42
4.7.4 Quantificação do teor de ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i>	45
4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAPSAICINA DE <i>Capsicum chinense</i> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	46
4.8.1 Sistema cromatográfico	46
4.8.2 Determinação das condições cromatográficas e <i>system suitability</i> (adequação do sistema)	46
4.8.3 Validação da metodologia analítica	46
4.8.4 Quantificação do teor de capsaicina no extrato etanólico bruto de <i>Capsicum chinense</i>	48

4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTO (EEB), FRAÇÕES E PADRÕES DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i> FRENTE A BACTÉRIAS E FUNGOS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	49
4.9.1 Reativação dos micro-organismos	51
4.9.2 Determinação da CIM para bactérias	51
4.9.3 Determinação da CIM para fungos	53
4.9.4 Controles	54
4.9.5 Classificação da atividade antimicrobiana	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	Erro! Indicador
5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	Erro! Indicador
5.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	Erro! Indicador
5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS DA DROGA VEGETAL, EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO e EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> e <i>Capsicum chinense</i>	Erro! Indicador
5.4.1 Preparo da curva padrão para quantificação do teor de compostos polifenólicos	Erro! Indicador
5.4.2 Quantificação do teor de polifenóis totais, taninos e flavonoides	Erro! Indicador
5.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL, DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E DO EXTRATO CONCENTRADO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> E <i>Origanum vulgare</i>	Erro! Indicador
5.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i> L. POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	Erro! Indicador
5.6.1 Determinação das condições cromatográficas e <i>system suitability</i> (adequação do sistema)	Erro! Indicador
5.6.2 Validação da metodologia analítica	Erro! Indicador
5.6.3 Quantificação do teor de ácido rosmarínico no extrato líquido concentrado de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i>	Erro! Indicador

5.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAPSAICINA DE <i>Capsicum chinense</i> POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	Erro! Indicador
5.7.1 Determinação das condições cromatográficas e <i>system suitability</i> (adequação do sistema)	Erro! Indicador
5.7.2 Validação da metodologia analítica.....	Erro! Indicador
5.7.3 Quantificação do teor de capsaicina na droga vegetal e extrato etanólico bruto de <i>Capsicum chinense</i>	Erro! Indicador
5.8 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTO, FRAÇÕES E PADRÕES DE <i>R. officinalis</i> , <i>O. vulgare</i> e <i>C. chinense</i> FRENTE A BACTÉRIAS E FUNGOS DETERMINADA PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO	Erro! Indicador
5.8.1 Atividade antimicrobiana de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i>	Erro! Indicador
5.8.2 Atividade antimicrobiana de <i>Capsicum chinense</i>	Erro! Indicador
CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador
REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS	109

1 INTRODUÇÃO

O interesse por produtos derivados de plantas medicinais que apresentem atividade antimicrobiana está se intensificando, especialmente devido ao aumento de relatos da resistência de micro-organismos frente aos medicamentos disponíveis no mercado (ARAÚJO, 2010), apesar de existirem medidas de controle e intervenção em relação ao uso de antibióticos (CORNAGLIA, 2009).

Medicamentos, que antes eram eficazes contra infecções por estafilococos comuns, hoje não são mais utilizados, já que os micro-organismos adquiriram resistência aos antibióticos, como é o caso do *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA). Há um aumento no custo do tratamento e surge a necessidade de buscar novos medicamentos (CORNAGLIA, 2009). Desta forma, o estudo sobre atividade antimicrobiana com extratos de plantas medicinais representa uma ótima alternativa para pesquisas (ARAÚJO, 2010; MENDES et al., 2011).

De acordo com Silva e Fernandes Júnior (2010), dados sobre atividade antimicrobiana de plantas medicinais, antes considerados empíricos, foram confirmados, bem como o aumento do número de micro-organismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos comercialmente disponíveis. Os autores enfatizam a importância do uso de plantas com o intuito de controlar o crescimento de patógenos e de se descobrir os componentes presentes na planta, que são responsáveis pela atividade biológica.

Algumas plantas medicinais apresentam um amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra algumas bactérias e fungos (SILVA, 2010). Isso pode ser explicado pelo fato das plantas produzirem uma grande diversidade de metabólitos secundários, o que aumenta a probabilidade da ocorrência de interações sinérgicas entre os compostos produzidos, garantindo uma melhor atividade biológica (HASSAN, 2012; NELSON; KURSAR, 1999).

Entretanto, o interesse na obtenção de novos compostos com atividade antimicrobiana não se restringe à área dos medicamentos. Apesar dos avanços nas tecnologias para o controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos, os consumidores se tornaram mais exigentes e estão interessados em uma substituição progressiva de compostos sintéticos em sistemas de conservação de alimentos por conservadores naturais (CASTILHO et al., 2012; SHAN et al., 2007; WEERAKKODY et al., 2010).

Assim, os conservadores “naturais” representam uma alternativa interessante, uma vez que podem aumentar a vida útil dos alimentos, bem como aumentar a segurança microbiológica do produto (BAYOUB et al., 2010; CASTILHO et al., 2012; SCHNEID et al., 2011; SHAN et al., 2007). Isso vai propiciar alimentos com alta qualidade, mais seguros, com longa vida de prateleira sob refrigeração (WEERAKKODY et al., 2010), e, principalmente, livre de conservadores os aditivos sintéticos, que geralmente têm sua segurança questionada (SCHNEID et al., 2011).

Os aditivos são produtos acrescentados aos alimentos que possuem a finalidade de aumentar o tempo de conservação e atribuir ou realçar algumas características próprias de alguns alimentos. Dentre os conservantes com propriedades antimicrobianas mais utilizados em alimentos estão: os benzoatos, ácido cítrico, nitratos e nitritos, parabenos, salicilatos, ácido sórbico e sulfitos. Contudo, esses aditivos podem apresentar reações adversas, como eczema, urticária, asma, angioedema e outros efeitos mais graves como o choque anafilático, efeito carcinogênico, mutagênico e tóxico. Essas reações adversas não são interessantes para o consumidor e em muitos produtos está havendo a substituição de aditivos artificiais por aditivos naturais, derivados de plantas (AUN et al., 2011).

É neste contexto que se insere a importância do presente estudo, que busca avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações de plantas medicinais, que são utilizadas como condimentos alimentares, frente a diversos patógenos, alimentares ou não. O alecrim (*Rosmarinus officinalis* Linn.), o orégano (*Origanum vulgare* Linn.) e a pimenta habanero (*Capsicum chinense* Jack.) são frequentemente utilizados como condimento na culinária brasileira e, em alguns estudos, apresentaram atividade inibitória frente a vários micro-organismos (ABDEL-MASSIH et al., 2010; ARCILA-LOZANO et al., 2004; BAYOUB et al., 2010; CARVALHO, 2004; CHAN et al., 2012; CICHEWICZ; THORPE, 1996; CORRÊA et al., 2012; DE FALCO et al., 2013; MORENO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2013).

Neste trabalho foi feito um estudo com três espécies vegetais: *Rosmarinus officinalis* Linn. (Lamiaceae), *Origanum vulgare* Linn. (Lamiaceae) e *Capsicum chinense* Jack. (Solanaceae) quanto a sua atividade antimicrobiana. Caracterizou-se a droga vegetal e o extrato líquido concentrado e obteve-se o extrato etanólico bruto. Este foi submetido a um processo de partição e foram obtidas quatro frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e aquosa. Os extratos etanólicos bruto foram submetidos à validação de seu principal marcador e quantificados tanto na droga vegetal, quanto nos extratos etanólicos bruto. Por fim, os extratos etanólicos brutos e as frações obtidas foram submetidos ao teste de

concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo para verificar sua atividade inibitória frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como de fungos leveduriformes e filamentosos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Existem evidências do uso das plantas com fins medicinais desde o início das civilizações. Os conhecimentos iniciais, relacionados ao seu potencial curativo, foram transmitidos gradualmente às gerações que se seguiram. Este conjunto de saberes empíricos e intuitivos foram repassados por meio de formas primitivas de registros, da fala e de documentos escritos (HALBERSTEIN, 2005; PETROVSKA, 2012). No início, não havia informações suficientes sobre as doenças e os mecanismos de ação dos metabólitos das plantas. Com o desenvolvimento de pesquisas foi possível migrar desse conhecimento empírico para o conhecimento científico e experimental (PETROVSKA, 2012).

Devido ao fato das plantas não apresentarem mobilidade, elas desenvolveram estratégias de defesa contra possíveis fatores ambientais externos que seriam prejudiciais ao seu desenvolvimento e sobrevivência (NCUBE; FINNIE; VAN STADEN, 2012). Isto inclui a engenharia da própria polinização e dispersão das sementes, fornecimento de nutrientes para sintetizar seu alimento e a defesa desenvolvida pelas plantas contra possíveis patógenos e herbívoros (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Os mecanismos de proteção das plantas podem envolver a defesa física, como a presença de espinhos, pelos, tricomas e ceras recobrimdo a superfície de caules e frutos (SOARES; MACHADO, 2007), e defesa química, com a produção de substâncias biologicamente ativas que podem ser tóxicas (MOLES et al., 2013) ou por possuírem ainda a defesa contra agressões de parasitas biológicos, bem como contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (WALLACE, 2004).

2.2 PLANTAS COMO ANTIMICROBIANOS E CONSERVADORES NATURAIS

Nos últimos anos, cerca de 250 mil espécies vegetais superiores foram descritas, sendo que apenas 17% foram avaliadas de acordo com aspectos biológicos (MAMEDOV, 2012), apenas 4–10% foram estudadas quanto à atividade antimicrobiana e várias classes de metabólitos secundários foram citadas (alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, fenóis, terpenoides, glicosídeos, antraquinonas, cumarinas, polifenóis e esteroides) (ENYIUKWU et al., 2014).

Existem vários desafios na indústria alimentícia em relação à segurança alimentar, no que tange ao tempo de armazenamento dos alimentos. Assim, vários conservantes sintéticos são utilizados pelas indústrias para evitar a deterioração de alimentos e a proliferação de patógenos alimentares (SULTANBAWA, 2011). Contudo, os consumidores estão preocupados com a segurança de alimentos que contenham conservantes sintéticos (WEERAKKODY et al., 2010) e há a preferência por conservadores naturais, como extratos a base de ervas e especiarias (SHAN et al., 2007).

Para contornar este problema, há um crescente interesse em métodos inovadores para a conservação de alimentos, sendo que a utilização de produtos vegetais como antimicrobiano e conservador natural é uma opção atraente tanto para os consumidores, quanto para as indústrias alimentícias (SULTANBAWA, 2011).

Essa realidade tem impulsionado a busca por alternativas naturais de conservação de alimentos contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes. O uso de extratos, frações e compostos ativos de ervas medicinais, também utilizadas como condimentos, pode ser uma alternativa, já que apresentam em sua composição compostos fenólicos e óleos essenciais, alguns já descritos por possuírem atividade antimicrobiana (CASTILHO et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2000; WEERAKKODY et al., 2010).

2.3 FAMÍLIA LAMIACEAE

A família Lamiaceae, anteriormente conhecida como família Labiatae, possui aproximadamente 240 gêneros e 7.200 espécies, sendo que a grande maioria dessas espécies são aromáticas, com uma grande diversidade química, e apresentando uma larga história de uso na medicina popular, na culinária, bem como na produção de fragrâncias e cosméticos (BRAUCHLER; MEIMBERG; HEUBL, 2010; DO et al., 2014; LEE et al., 2011; MARIN et al., 2006).

Esta família apresenta várias espécies ricas em compostos fenólicos e muitos já foram identificados quimicamente, tais como: ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gentísico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, luteonina, quercetina, rutina, epicatequina e catequinas (ZGÓRKA; GŁOWNIAK, 2001; MORENO et al., 2006; LEE et al., 2011).

São descritas na família Lamiaceae sete subfamílias, sendo que a Nepetoideae abrange aproximadamente metade das espécies de Lamiaceae. Muitas delas são utilizadas como

condimentos ou por apresentarem propriedades medicinais, como *Origanum vulgare* L. (orégano), *Thymus vulgaris* L. (tomilho), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Mentha piperita* L. (hortelã), *Melissa officinalis* L. (erva-cidreira), *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e *Lavandula officinalis* L. (lavanda) (DREW; SYTSMA, 2012).

Considerando dados moleculares e filogenéticos, a subfamília Nepetoideae foi organizada em quatro tribos: Elsholtzieae, Ocimeae, Lavanduleae e Mentheae. A tribo Mentheae está subdividida em três subtribos (Salviinae, Nepetinae e Menthinae) e engloba 43 dos 66 gêneros. Várias espécies medicinais pertencem a esta tribo, como é o caso do orégano (*Origanum vulgare* – Menthinae) e do alecrim (*Rosmarinus officinalis* – Salviinae) (BRAUCHLER; MEIMBERG; HEUBL, 2010).

2.3.1 *Rosmarinus officinalis* Linn.

Rosmarinus officinalis Linn. é uma planta aromática (ZANELLA et al., 2012) conhecida popularmente como alecrim, alecrim-da-horta, alecrim-de-cheiro, alecrim-de-jardim, alecrim-rosmarinho, alecrim-rosmarino, alecrinzeiro, erva-da-graça, libanotis e rosmarinho (BEGUM et al., 2013). É originária de regiões em torno do mar Mediterrâneo, como a Europa, Ásia e África, e amplamente distribuída em diversas partes do mundo, incluindo o Brasil (BOIX et al., 2010; MULINACCI et al., 2011).

O alecrim é uma planta subarborescente, perene e lenhosa que pode atingir até dois metros de altura. Suas folhas são sésseis, opostas, lineares, com pelos estelares na face inferior com coloração esbranquiçada, e face superior verde escura; seu caule é lenhoso com várias ramificações; suas flores são hermafroditas, diminutas, bilabiadas, podendo ter coloração azul-claro a esbranquiçada, o fruto é simples, seco e com coloração cinza (COUTO, 2006; VAZ, 2006).

Como relevância etnofarmacológica, comprovada por estudos pré-clínicos, está o uso do alecrim como antinociceptivo (MARTÍNEZ et al., 2012), antiespasmódico (VENTURA-MARTÍNEZ et al., 2011); antidepressivo (MACHADO et al., 2012); controle da glicemia (BAKIREL et al., 2008), anti-inflamatório (ALTINIER et al., 2007; BENINCÁ et al., 2011), antioxidante (ZAOUALI et al., 2010), proteção contra hepatotoxicidade (ABDEL-WAHHAB et al., 2011; AMIN; HAMZA, 2005), prevenção de câncer (NGO et al., 2011) e antimicrobiano (ZAOUALI et al., 2010).

Moreno et al. (2006), em um estudo sobre atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de alecrim, sugerem que a atividade antimicrobiana esteja relacionada com a sua composição fenólica, como os ácidos carnósico e rosmarínico, alguns dos compostos bioativos presentes nos extratos de alecrim.

Os componentes presentes no óleo essencial de *R. officinalis* são α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol, cânfora, α -terpineol, verbenona e cariofileno. Muitos deles já estão relacionados com a atividade antimicrobiana (MAY et al., 2010).

Já foi demonstrado que o óleo essencial de alecrim apresenta uma boa atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e frente a diversos patógenos alimentares, como *Bacillus cereus* (ATCC 1247); *Clostridium perfringens* (ATCC 1324); *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (SILVA et al., 2013).

O óleo essencial de alecrim também se apresentou ativo frente a cepas isoladas de leite e queijo, como *Geobacillus stearothermophilus*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis* var. *niger*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* (ŽIŽOVIC et al., 2009). Em um estudo conduzido por Ribeiro et al. (2013), verificou-se que o óleo essencial de alecrim demonstrou atividades inibitória frente a uma cepa de *E. coli* multirresistente, isolada de queijo coalho.

Chan et al. (2012) realizaram um estudo comparativo da atividade antimicrobiana e antioxidante entre ervas da família Lamiaceae e destacaram resultados interessantes em relação às folhas de alecrim, que apresentaram inibição frente a *B. cereus*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus*. Verificou-se também que entre as plantas estudadas, o alecrim e a sálvia foram as ervas que apresentaram propriedades antibacterianas mais evidentes.

Estudos envolvendo atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de alecrim também foram realizados. O extrato etanólico de alecrim apresentou atividade moderada contra *L. monocytogenes* (BAYOUB et al., 2010). Em um estudo realizado por Bubonja-Sonje et al. (2011), o extrato de alecrim apresentou boa atividade contra cepas ATCC e isolados clínicos invasivos de *Listeria monocytogenes*, quando comparado com extrato de azeite de oliva e cacau.

Também foi relatado que o extrato bruto, fração aquosa e fração acetato de etila de *R. officinalis* apresentaram efeito inibitório e bactericida (em altas concentrações) frente a *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Verificaram que o extrato bruto (CIM = 20.000 $\mu\text{g/mL}$), a fração acetato de etila (CIM = 10.000 $\mu\text{g/mL}$) e a fração aquosa (CIM = 80.000 $\mu\text{g/mL}$) de *R.*

officinale apresentaram atividade inibitória e bactericida sobre essas bactérias (ABDELMASSIH et al., 2010).

2.3.2 *Origanum vulgare* Linn.

Origanum vulgare Linn. é conhecido popularmente como orégano, originário da região do mediterrâneo, e amplamente distribuído em regiões do norte da África e em zonas temperadas e áridas da Eurásia. Espécies de *O. vulgare* também foram encontradas no Norte da América (CRISHTI; KALOO; SULTAN, 2013).

Além da espécie *O. vulgare*, outras espécies também são chamadas de orégano, tais como: o orégano grego (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart), o orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* (L.) Hoffmann & Link), o orégano turco (*Origanum onites* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* L.) (DE MARTINO et al., 2009).

O. vulgare possui 6 subespécies, que são diferenciadas de acordo com seu indumento, número de glândulas fixas nas folhas, tamanho e cor de brácteas e flores. São elas: *O. vulgare* subsp. *vulgare*, *O. vulgare* subsp. *glandulosum* (Desfontaines) Ietswaart, *O. vulgare* subsp. *gracile* (Koch) Ietswaart, *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Link) Ietswaart, *O. vulgare* subsp. *viridulum* (Martrin-Donos) Nyman e *O. vulgare* subsp. *virens* (Hoffmannsegg and Link) Ietswaart. (CRISHTI; KALOO; SULTAN, 2013).

As espécies de orégano são subarbustos ou ervas perenes que geralmente possuem de dois a três centímetros de altura, contudo outras podem chegar até 39 cm de altura. As folhas podem ser redondas ou ovais e as hastes possuem o formato de coração, podendo ser lenhosas ou não. As flores podem ser de diferentes cores: rosa, roxa ou branca, e dispostas à direita ou serem eretas (MEYERS, 2005).

Os componentes presentes no óleo essencial de *O. vulgare* são o timol, sabineno, terpineol, cariofileno, carvacrol e outros (CORRÊA et al., 2010). Para o óleo essencial os compostos majoritários são o carvacrol e o timol. Outros compostos fenólicos estão presentes nas folhas de *O. vulgare*, como o ácido *o*-cumárico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico e o ácido rosmarínico. Há também em sua composição os ácidos triterpênicos, ácido ursólico e ácido oleanólico, conhecidos popularmente por sua ação anti-inflamatória, antidiabético e hepatoprotetor (AGIOMYRGIANAKIA; DAISA, 2012).

Em uma revisão sobre a importância medicinal do gênero *Origanum*, verificou-se que o mesmo possui atividade antimicrobiana, antioxidante, antitrombina, antimutagênica, angiogênica e anti-hiperglicemiante (CRISHTI; KALOO; SULTAN, 2013).

Em um estudo sobre atividades biológicas do extrato de *O. vulgare*, conduzido por Arcila-Lozano et al. (2004), foi observado uma boa atividade antioxidante e boa atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*.

O óleo essencial de *O. vulgare* apresentou atividade antimicrobiana principalmente frente a patógenos Gram-positivos, como *B. cereus* e *B. subtilis* (DE FALCO et al., 2013). Busatta et al. (2007) relataram que o óleo essencial do orégano, adicionado em linguças frescas, apresentou atividade inibitória sobre patógenos alimentares, bem como aumentou a vida de prateleira da linguça. Contudo, os autores ressaltaram que a adição do óleo essencial à linguça contribuiu para alteração do sabor.

2.4 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, amplamente distribuídos, produzidos pela maioria das plantas, sendo que já foram detectados mais de 10 mil compostos deste grupo (SILVA et al., 2010; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Os compostos fenólicos são denominados como um conjunto heterogêneo de moléculas, que compartilham a característica de possuírem em sua estrutura grupos benzênicos ligados a hidroxilas (HERNÁNDEZ; PRIETO GONZÁLES, 1999). Pertencem ao grupo dos compostos fenólicos várias classes químicas, como os fenóis simples e ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides e taninos (SULTANBAWA, 2011).

Essas substâncias são produzidas em decorrência do metabolismo secundário das plantas, estimuladas por mecanismos de integração com o ambiente ao qual elas estão inseridas (CASTRO et al., 2004). Uma série de vias bioquímicas permite a síntese de vários compostos que aumentam a capacidade da planta sobreviver e interagir com o meio ambiente (KENNEDY; WIGHTMAN, 2011).

Alguns desses metabólitos secundários são responsáveis pela coloração dos vegetais que participam dos alimentos (SILVA et al., 2010), bem como pelas suas propriedades sensoriais, além de apresentarem propriedades antioxidantes e antimicrobianas (MORENO et al., 2006; SULTANBAWA, 2011).

2.5 FAMÍLIA SOLANACEAE

A família Solanaceae compreende apenas oito gêneros, com a característica de serem plantas herbáceas ou lenhosas (ADEDEGI; AJUWON; BABAWALE, 2007). Pertencem a esta família espécies vegetais importantes, usadas tanto na culinária quanto na indústria alimentícia, como a batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e o pimentão (*Capsicum annuum* L.) (EGBUCHA; MALGWI; UNAMBA, 2013; HELMJA et al., 2007).

É a terceira família mais importante, superada apenas por gramíneas e leguminosas, e abrange 102 gêneros e mais de 3000 espécies (RIGANO et al., 2013) e cerca de 60 a 70% das espécies produzem alcaloides. É encontrada principalmente em áreas tropicais (CASTILLO-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ-OSORNIO; DELGADO-HERRERA, 2010), contudo alguns gêneros da família Solanaceae são distribuídos mundialmente (GEMEINHOLZER; WINK, 2001).

A família Solanaceae é conhecida por suas propriedades ansiolíticas, sendo que a palavra *Solanum* deriva do termo *Solari*, que significa “para aliviar”. Dependendo da espécie, podem produzir alguns compostos bioativos como: alcaloides pirrolidínicos, pirrólicos e tropânicos; protoalcaloides; glicoalcaloides; nicotina; capsaicinoides; diterpenos tetracíclicos; glicosídeos esteroidais (CASTILLO-SÁNCHEZ; JIMÉNEZ-OSORNIO; DELGADO-HERRERA, 2010; GEMEINHOLZER; WINK, 2001; GIORGETTI; NEGRI, 2011).

2.5.1 *Capsicum chinense* Jacq.

O gênero *Capsicum* compreende 5 importantes espécies: *Capsicum annuum* L. (pimentão), *Capsicum frutescens* L. (pimenta malagueta), *Capsicum baccatum* L. (Dedo de moça), *Capsicum pubescens* R. & P. (pimenta cabeluda) e *Capsicum chinense* Jacq. (pimenta habanero) (PINO; SAURI-DUCH; MARBOT, 2006).

Capsicum chinense Jacq. é uma espécie originária de zonas tropicais e úmidas do centro e sul da América. Além de *C. chinense* existem ainda duas espécies reconhecidas por serem picantes, que são: *C. annuum* e *C. frutescens*. Popularmente, a espécie *C. chinense*, é conhecida por pimenta habanero (MENICHINI et al., 2009).

Existem evidências arqueológicas do México de uso de pimentas da família Solanaceae como alimento desde 7.200 a.C. (WALSH; HOOT, 2001). A pimenta é uma especiaria muito utilizada na culinária tradicional mexicana, devido a sua pungência e sabor. São muito utilizadas como conservantes (CHINN; SHARMA-SHIVAPPA; COTTER, 2011), e aromatizantes em molhos, sopas, carnes processadas, salgadinhos, doces, refrigerantes e bebidas alcoólicas (PINO et al., 2007).

As pimentas contêm altos níveis de compostos fenólicos (flavonoides), vitaminas (vitamina A e C), carotenoides e capsaicinoides (MENICHINI et al., 2009; ZHUANG et al., 2012). Os capsaicinoides são um grupo de doze ou mais alcaloides que estão relacionados com a pungência das pimentas deste gênero. Os principais responsáveis pela sensação picante são a dihidrocapsaicina e a capsaicina, sendo que o teor de capsaicinoides depende do estágio de desenvolvimento dos frutos, do cultivar, manejo após colheita e condições ambientais (MENICHINI et al., 2009; ZHUANG et al., 2012), calor, aquecimento e exposição ao sol podem diminuir os teores de capsaicinoides (GOVINDARAJAN; SALZER, 1986).

Os frutos do gênero *Capsicum* foram utilizados por muito tempo como alimento e por suas propriedades medicinais. Já foi relatado seu uso popular em picadas de cobras, em alívio de dores de dente e em urticária (RODRÍGUEZ; ANGULO-SÁNCHEZ; HERNÁNDEZ-CASTILHO, 2006).

Estudos mostraram que as pimentas do gênero *Capsicum* podem estar relacionadas com a ação antioxidante (BAE et al., 2012; TUNDIS et al., 2013; ZIMMER et al., 2012), hipoglicemiante (TUNDIS et al., 2013) e anti-inflamatória (ZIMMER et al., 2012).

Cichewicz e Thorpe (1996) relataram que extratos de espécies do gênero *Capsicum* foram ativos frente a *B. cereus*, *B. subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tetani* e *Streptococcus pyogenes*.

Em estudo realizado por Corrêa et al. (2012), o extrato bruto de *C. chinense* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias: *M. luteus* ATCC 10240, *S. thyphimurium* ATCC 14028, *E. faecium*, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *S. aureus* ATCC 6538. Outro estudo verificou atividade antimicrobiana de extratos, pelo método de difusão em disco, frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. O extrato obtido com acetonitrila foi mais eficaz contra as bactérias testadas, com exceção da *E. coli* e *Erwinia* sp. (AMRUTHRA; RAJ; LEBEL, 2013).

Uma fração peptídica de *C. chinense* apresentou atividade boa contra micro-organismos, como *S. aureus*, *E. coli* e *Shigella flexnerii*, com zonas de inibição variando de 5,8 a 14 mm, pelo método de difusão em ágar (BRITO-ARGÁEZ et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar drogas vegetais (DV) e extratos líquidos concentrados (ELC) e extratos etanólicos brutos (EEB); determinar o teor de polifenóis, taninos, flavonoides, quantificar o marcador escolhido e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos brutos e frações de *Rosmarinus officinalis* Linn., *Origanum vulgare* Linn., e *Capsicum chinense* Jack frente a cepas padrão, isolados clínicos e alimentares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a droga vegetal (DV), o extrato líquido concentrado (ELC) e extrato etanólico bruto (EEB) de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *C. chinense*.
- Covalidar o método de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para determinar os teores de ácido rosmarínico na droga vegetal (DV), no extrato líquido concentrado (ELC) e no extrato etanólico bruto (EEB) de *R. officinalis* e *O. vulgare* L.
- Validar o método de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) para determinar os teores de capsaicina na droga vegetal (DV), no extrato líquido concentrado (ELC) e no extrato etanólico bruto (EEB) de *C. chinense*.
- Determinar o rendimento das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e aquosa dos extrato etanólico bruto (EEB) de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *C. chinense* obtidas por meio de partições
- Realizar o teste de microdiluição em caldo, utilizando extrato etanólico bruto (EEB) e frações de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *C. chinense*, padrões de ácido rosmarínico e capsaicina, para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cepas padrão, isolados clínicos e alimentares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS MATERIAIS VEGETAIS

As amostras de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* foram obtidas comercialmente de fornecedores locais de drogas vegetais. Os frutos frescos de *Capsicum chinense*, melhorados geneticamente no intuito de aumentar o teor de capsaicina, foram fornecidos pela Embrapa Hortaliças, Brasília – DF.

No Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (LPPN/UFG), os frutos de *C. chinense* foram limpos e secos em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C, durante 48 h. Em seguida, os frutos secos passaram por moagens sucessivas, primeiramente em um moinho de facas (TE-625 Tecnal Ltda, Piracicaba, SP, Brasil), depois em um liquidificador industrial (Poli-Metalúrgica Siemsem Ltda., Brasil) e, por último, em um processador (Modelo BBE 30 Electrolux, Brasil).

As folhas rasuradas de *R. officinalis* e *O. vulgare* também passaram por moagens sucessivas, primeiramente em liquidificador industrial (Poli-Metalúrgica Siemsem Ltda., Brasil), e posteriormente moídas em processador (Modelo BBE 30 Electrolux, Brasil).

As drogas vegetais foram acondicionadas em recipiente de polietileno e congeladas (-20 °C) para caracterização e obtenção do extrato líquido concentrado (ELC).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS DROGAS VEGETAIS

4.2.1 Determinação do teor de voláteis (TV) e teor de sólidos (TS)

Para a determinação do teor de voláteis, foi utilizado um analisador de umidade que possui aquecimento por lâmpada de halogênio 400 W (MB 35 Ohaus, Brasil), e determina o teor de voláteis (TV) em porcentagem, exibindo-o no display do aparelho.

O teor de sólidos foi obtido diminuindo-se de 100% o percentual do teor de voláteis medido pelo analisador de umidade, como mostra a Equação 1:

$$TS (\% m/m) = 100 - TV (\% m/m) \quad (1),$$

em que: TS = Teor de sólidos (%); TV = Teor de Voláteis (%).

Os experimentos foram realizados em triplicata com amostras de 0,5 g da droga vegetal (BRASIL, 2010).

4.2.2 Determinação do teor de cinzas totais (TCT)

Alíquotas de 3 g da droga vegetal (DV) foram distribuídas em cadinhos de porcelana previamente calcinados e, incineradas em mufla (EDG COM 1P 3000, Brasil), aumentando-se gradativamente a temperatura: 30 min a 200 °C, 60 min a 400 °C e 90 min a 600 °C. Após a calcinação, foram resfriadas em dessecador e pesadas (BRASIL, 2010).

O teor de cinzas totais (TCT) foi calculado como percentual pela média de três determinações independentes, segundo a Equação 2:

$$TCT (\% m/m) = (m1/m2) \times 100 \quad (2),$$

em que: $m1$ = massa do cadinho mais amostra calcinada; $m2$ = massa do cadinho mais amostra antes da calcinação.

4.2.3 Determinação do índice de intumescência (II)

Amostras de 1 g das drogas vegetais (DV) foram colocadas em provetas de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 25 mL de água destilada e as provetas foram agitadas manualmente a cada 10 min., durante 1 h. Após repouso de três horas, à temperatura ambiente, foram verificados os volumes finais ocupados pelas amostras (BRASIL, 2010). O II foi calculado, em mililitros, pela média das determinações, em triplicata, de acordo com a Equação 3:

$$II = V_f - V_i \quad (3),$$

em que: V_f = volume final ocupado pela amostra (mL); V_i = volume inicial ocupado pela amostra (mL).

4.2.4 Determinação da distribuição granulométrica (DG)

Amostras de 25 g das drogas vegetais (DV) foram pesadas em balança analítica e colocadas sobre um jogo de tamises previamente pesados, de malhas 710; 355; 300; 250; 180; 125 µm, providos de tampa e recipiente para coleta de pó. Os tamises foram agitados em um Agitador Eletromagnético de Peneiras para Análise Granulométrica (Bertel[®], Brasil), durante quinze minutos e pesados para verificar a quantidade de pó remanescente em cada um (BRASIL, 2010).

4.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) DE *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense*.

Os extratos líquidos concentrados (ELC) de *R. officinalis* e *O. vulgare* foram obtidos por percolação, utilizando como líquido extrator álcool etílico/água (80% v/v) (COUTO, 2011; MORAES et al., 2011) e concentradas em evaporador rotatório. O ELC de *C. chinense* também foi obtido por percolação, porém o líquido extrator foi a mistura álcool etílico/água (86% v/v) (informação pessoal - Leonardo Luiz Borges, 2014).

Para a extração, colocaram-se 2 kg de material vegetal em 10 litros do líquido extrator e deixou-se em repouso para a etapa de pré-intumescimento por 2 horas. Em seguida, na etapa de maceração, colocou-se a mistura em agitador mecânico digital (TC 039/11 Tecnal) a 1000 rpm por 12 horas. Após esse período, a mistura foi colocada em um percolador, que continha camadas de algodão, bem como filtros, para reterem o pó remanescente. O percolado foi coletado e o processo foi repetido por 5 vezes consecutivas.

O extrato obtido foi concentrado em um rotavapor (Büchi[®] – modelo R-220 SE, Suíça), a 40 °C. Os ELC foram armazenados em frascos de polietileno e mantidos a -20 °C.

4.3.1 Determinação do pH

O valor de pH foi determinado utilizando um pHmetro (Tecnal[®] Tec – 3MP, Brasil) previamente calibrado com soluções tampão de referência 7,0 e 4,0 e eletrodo de vidro, por método potenciométrico, medindo-se a diferença de potencial entre dois eletrodos adequados, imersos na solução em análise (BRASIL, 2010).

4.3.2 Determinação do teor de voláteis (TV) e teor de sólidos (TS)

Este ensaio foi realizado de acordo com o item 4.2.1.

4.3.3 Determinação da densidade relativa (DR)

A densidade relativa foi determinada pelo método de picnômetro. Utilizaram-se picnômetro limpos e secos, previamente calibrados. Em seguida, determinou-se a massa do ELC, a 20 °C (BRASIL, 2010). A densidade foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$DR = (m2 - mv)/(m1 - mv) \quad (4),$$

em que: m1 = massa do picnômetro + água; m2 = massa do picnômetro + amostra; mv = massa do picnômetro vazio.

4.3.4 Determinação do teor alcoólico

O teor de álcool foi determinado de acordo com o método 1 (líquidos com menos de 30% de álcool) da Farmacopeia Brasileira V (BRASIL, 2010). Transferiu-se para aparelho destilador 35 mL do extrato etanólico intermediário, adicionando-se igual volume de água destilada. O líquido destilado foi coletado em uma proveta e adicionou-se água destilada para obter volume inicial da amostra. Foi determinada a densidade do líquido a 20 °C. O resultado obtido foi avaliado em porcentagem (v/v %) de etanol (C₂H₅OH) contido no líquido, pela Tabela Alcoométrica (anexo D - Farmacopeia Brasileira V, 2010).

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTO (EEB) E DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DE *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense*

O extrato etanólico bruto (EEB) foi obtido a partir do ELC, com a retirada do álcool presente no extrato à temperatura ambiente, até atingirem uma textura pastosa. Os EEB foram armazenados em recipientes de vidro e foram mantidos a -20 °C.

Pesou-se 50 g de EEB e realizou-se a dissolução deste em metanol/água, na proporção de 7:3. Esta mistura foi submetida a partições sucessivas (3 x 100 mL de solvente), com os solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila) de modo a se obter: fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração aquosa (FERRI, 1996). O rendimento das frações foi calculado pela Equação 5:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa da fração} / \text{massa do extrato bruto}) \times 100 \quad (5)$$

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS, TANINOS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS NA DROGA VEGETAL (DV), EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense*

4.5.1 Determinação do teor de polifenóis

Foi utilizado o método espectrofotométrico de Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987a), conforme descrito abaixo.

4.5.1.1 Extração de polifenóis

Para extração dos compostos polifenólicos da droga vegetal (DV), amostras de 750 mg foram adicionadas a 150 mL de água destilada e aquecidas em chapa quente (Quimis[®], Brasil) até ebulição. Após ebulição, foram colocados em banho-maria (Cientec[®] CT – 248, Brasil) sob refluxo à temperatura de 85 ± 5 °C por 30 min. Resfriou-se em água corrente e transferiu-se para balões volumétricos de 250 mL, completando-se os volumes com água destilada. Filtrou-se em papel de filtro qualitativo, desprezando-se os primeiros 50 mL dos filtrados.

Para extração dos compostos polifenólicos do ELC mediu-se 500 µL de amostras do extrato e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com água destilada. Colocou-se em lavadora ultrassônica (Unique[®], Brasil) por 20 minutos.

Para extração dos compostos polifenólicos do EEB pesaram-se 43 mg de *R. officinalis* e transferiram-se para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se com água destilada. Para o extrato concentrado de *O. vulgare*, procedeu-se do mesmo modo, diferenciando-se apenas a quantidade pesada, que foi aproximadamente 40 mg.

Todas as extrações foram feitas em triplicata.

4.5.1.2 Quantificação do teor de compostos polifenólicos

4.5.1.2.1 Preparo da curva padrão de ácido tânico

Pesaram-se 100 mg do padrão de ácido tânico (Vetec[®], Brasil) e transferiram-se para um balão volumétrico de 100 mL, adicionaram-se 40 mL de metanol 50 % (v/v) e completou-se o volume para 100 mL. Em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS, 1 % m/v) / trietanolamina (TRI, 5 % v/v) / isopropanol (ISOP, 20 % v/v) e 1 mL de solução de cloreto de ferro(III), foram adicionadas alíquotas de 100; 200; 300; 400; 500 e 600 µL da solução de ácido tânico e completou-se o volume para 4 mL com água destilada. Homogeneizou-se em um agitador de tubos, deixou-se em repouso por 15 min. Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e procedeu-se a leitura da absorbância a 510 nm em espectrofotômetro (Biospectro[®] Espectrofotométrico SP – 220, Brasil), homogeneizou-se novamente.

Para avaliação dos resultados obtidos para a curva padrão, foi realizada análise de regressão linear, calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear da reta (r). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

4.5.1.2.2 Teor de polifenóis totais (TPT)

Adicionou-se alíquotas de 1 mL das soluções extrativas obtidas em tubos contendo 2 mL de solução aquosa de LSS/TRI/ISOP e 1 mL de solução de cloreto de ferro(III). Agitou-se e deixou-se em repouso por 15 min. Após esse período, agitou-se novamente e fez-se a leitura das absorbâncias em 510 nm. Utilizou-se como branco uma solução contendo 2 mL de solução aquosa de LSS/TRI/ISOP, 1 mL de solução de cloreto de ferro(III) e 1 mL de água destilada. Através da curva padrão de ácido tânico e das diluições das amostras, a porcentagem de polifenóis totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a Equação 6:

$$TPT (m/m\%) = (C \times FD \times 100) / m \quad (6),$$

em que: C = valor correspondente à concentração da amostra (µg/mL) de acordo com a curva padrão de ácido tânico; FD = fator de diluição; m = massa.

4.5.2 Determinação do teor de taninos totais

Foi utilizado o método espectrofotométrico de Hagerman e Butler (MOLE; WATERMAN, 1987b) conforme descrito abaixo.

4.5.2.1 Extração de taninos

Para extração de taninos da droga vegetal pesou-se uma amostra de 750 mg da droga vegetal e transferiu-se para balão de fundo chato de 250 mL. Adicionou-se 150 mL de água destilada, aqueceu-se em chapa quente até ebulição. Em seguida, colocou-se em banho-maria sob refluxo à temperatura entre 85 ± 5 °C por 30 min. Resfriou-se em água corrente e transferiu-se para balões volumétricos de 250 mL, completando-se os volumes com água destilada. Filtrou-se em papel de filtro qualitativo, desprezando os primeiros 50 mL dos filtrados.

Para extração de taninos totais do ELC mediu-se 6 mL de extrato de *R. officinalis* e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL. Completou-se o volume com água destilada. O mesmo procedimento foi realizado *O. vulgare*, utilizando 3 mL do extrato em 25 mL de água destilada. Colocou-se em lavadora ultrassônica por 20 minutos.

Para extração de taninos do EEB pesaram-se 0,10 g de *R. officinalis* e 0,12 g do extrato concentrado de *O. vulgare*, e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se com água destilada.

Todas as extrações foram feitas em triplicata.

4.5.2.2 Quantificação do teor de taninos totais

4.5.2.2.1 Preparo da curva padrão de ácido tânico

Pesou-se 100 mg do padrão de ácido tânico e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 40 mL de metanol 50% (v/v) e completou-se o volume para 100 mL. Em tubos de ensaio, adicionaram-se alíquotas de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µL da solução de padrão de ácido tânico e completou-se o volume para 1 mL de água destilada. Logo em seguida, adicionaram-se 2 mL de solução de albumina sérica bovina a 1 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,9). Agitou-se por 1 min e deixou-se em repouso por 20 min. Colocou-se os tubos em uma centrífuga (LOGEN Scientific[®], DCS – 16 – RV, Brasil) com 3000 rpm por 20 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi solubilizado com 4 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio (LSS, 1% m/v) / trietanolamina (TRI, 5% v/v) / isopropanol (ISOP, 20% v/v) e 1 mL de solução de cloreto de ferro(III). Homogeneizou-se em um agitador de tubos, deixou-se em repouso por 15 min. Antes de fazer a leitura da absorbância em 510 nm em espectrofotômetro, homogeneizou-se

novamente. Após a leitura, foi plotada uma curva da absorbância (u. a.) em função da concentração de ácido tânico ($\mu\text{g/mL}$).

Para avaliação dos resultados obtidos para a curva padrão, foi realizada análise de regressão linear, calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação linear da reta (r). Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

4.5.2.2.2 Teor de taninos totais (TTT)

Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL da solução de albumina e 1 mL das soluções da amostra. Após homogeneização, as soluções foram deixadas à temperatura ambiente por 20 min. Os tubos foram centrifugados por 15 min. a 3000 r.p.m. Desprezou-se os sobrenadantes e os precipitados foram dissolvidos em 4 mL de solução de LSS/TRI/ISOP, adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de ferro(III) e homogeneizou-se em agitador mecânico de tubos. Após 30 min mediram-se as absorbâncias a 510 nm. Utilizou-se como branco, uma solução contendo 4 mL de LSS/TRI/ISOP e 1 mL da solução de cloreto de ferro(III). Através da curva padrão de ácido tânico e das diluições das amostras a porcentagem de taninos totais foi calculada, como média de três replicatas, segundo a Equação 7:

$$TTT (m/m \%) = (C \times FD \times 100) / m \quad (7),$$

em que: C = valor correspondente à concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$) de acordo com a curva padrão de ácido tânico; FD = fator de diluição; m = massa.

4.5.3 Determinação do teor de flavonoides totais

Foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Rolim et al. (2005), com adaptações.

4.5.3.1 Extração de flavonoides

Para extração dos flavonoides das drogas vegetais de *R. officinalis* e *O. vulgare*, pesaram-se 500 mg e transferiram-se para balão de fundo redondo de 150 mL, adicionando-se 50 mL de solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). Para extração dos flavonoides da droga vegetal de *C. chinense*, pesaram-se 500 mg e transferiu-se para balão de fundo redondo

de 150 mL, adicionando-se 100 mL de solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). Colocou-se em banho-maria sob refluxo à temperatura de 95 ± 5 °C por 40 min. Resfriou-se em água corrente e filtrou-se através de papel de filtro qualitativo, desprezando os primeiros 50 mL dos filtrados.

Para extração dos flavonoides do ELC, transferiram-se 50 µL do extrato para balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1).

Para extração de flavonoides do EEB pesaram-se 135 mg de *R. officinalis* e transferiram-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se com água destilada. Para *O. vulgare*, procedeu-se do mesmo modo, diferenciando-se apenas a quantidade pesada, que foi aproximadamente 100 mg.

Todas as extrações foram feitas em triplicata.

4.5.3.2 Quantificação do teor de flavonoides totais

4.5.3.2.1 Preparo da curva padrão de rutina

Para o preparo da solução padrão de rutina, pesou-se 10 mg do padrão e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). Foram transferidas para tubos de ensaio alíquotas de 200; 400; 600; 800; 1000 µL. Completou-se o volume para 2 mL com a solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 361 nm. Cada ponto da curva foi feito em triplicata. Utilizou-se como branco 2 mL da solução de metanol: ácido acético 0,02 M (99:1).

4.5.3.2.2 Teor de flavonoides totais (TFT)

Adicionou-se a tubos de ensaio 2 mL das soluções extrativas obtidas. A porcentagem de flavonoides foi calculada por meio da curva padrão de rutina e das diluições das amostras, por meio da Equação 8:

$$TFT (m/m \%) = (C \times FD \times 100) / m \quad (8),$$

em que: C = valor correspondente à concentração da amostra ($\mu\text{g/mL}$) de acordo com a curva padrão de rotina; FD = fator de diluição; m = massa.

4.6 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO (CCD) DA DROGA VEGETAL (DV), EXTRATO LÍQUIDO CONCENTRADO (ELC) E EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DE *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*

O método utilizado foi o descrito pela Farmacopeia Portuguesa VIII (2005), com adaptações.

4.6.1 Preparo das amostras e do padrão

A solução padrão de ácido rosmarínico (Sigma Aldrich[®] – 97%) foi preparada na concentração de 0,05 mg/mL. Para o preparo da solução da droga vegetal (DV) de *R. officinalis*, foram adicionados 2,5 g da DV e colocadas em um balão de 25 mL. Completou-se o volume com metanol P.A. Para o preparo da solução do extrato líquido concentrado, foram dissolvidos 2,5 mL de ELC em 25 mL de metanol P.A. A solução do extrato etanólico bruto (EEB) foi preparada dissolvendo-se 0,527 g de EEB em 25 mL de metanol P.A. Da mesma forma foi feito para o as amostras de *O. vulgare*. Todas as amostras foram colocadas em lavadora ultrassônica por 20 minutos para extração.

4.6.2 Preparo da placa cromatográfica

O padrão de ácido rosmarínico e as amostras da droga vegetal e extratos tanto do *R. officinalis*, quanto do *O. vulgare* foram aplicadas com o auxílio de um capilar, na extremidade inferior de uma cromatoplaca de alumínio recoberta com sílica gel 60F254 (Merck[®]). A cromatoplaca foi colocada em uma cuba cromatográfica previamente saturada com o vapor da fase móvel composta por ácido fórmico anidro, acetona e diclorometano (5:15:80 v/v/v). Após a eluição a cromatoplaca foi secada à temperatura ambiente e sua visualização foi realizada em uma câmara de UV (Spectroline[®], Model ENF-280, Brasil) sob luz ultravioleta, 365 nm. Comparou-se o valor de fator de retenção (R_f) da banda do padrão de ácido rosmarínico com as bandas das amostras.

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO ROSMARÍNICO DE *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.7.1 Sistema cromatográfico

O teor de ácido rosmarínico foi determinado por análise em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência modelo e2695 (Waters[®]), equipado com bomba quaternária, sendo cada solvente bombeado por uma bomba específica, e detector de arranjo de diodos PDA (Waters[®]). A análise de dados foi realizada utilizando o software Empower 2.0.

4.7.2 Determinação das condições cromatográficas e *system suitability* (adequação do sistema)

Para a determinação do teor de ácido rosmarínico foi utilizada a metodologia validada proposta por Canelas e Costa (2007), com adaptações. A coluna cromatográfica utilizada foi RP-18, diâmetro médio da partícula de 5 µm, comprimento e diâmetro interno de 250 x 4,6 mm, respectivamente (Waters[®] – X-Terra[®]). O volume de injeção estabelecido foi de 20 µL. Como fase móvel empregou-se: solvente A – 30% (v/v) de acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker[®], México) e o solvente B – 70% (água ultrapura/ acetonitrila/ ácido fórmico; proporção 97:2,5:0,5 % v/v) sob uma vazão isocrática de 0,5 mL/min. O comprimento de onda de detecção foi de 329 nm, com uma varredura de 192 a 780 nm. As temperaturas da coluna e do carrossel das amostras foram mantidas a 30 °C. O tempo de análise da amostra e do padrão foi fixado em 30 min.

De acordo com a *Food and Drug Administration* – FDA (CDER, 1994), foram determinados os parâmetros do *system suitability*: Fator de Cauda (TF), Resolução (RS), Número de Pratos Teóricos (N) e Repetibilidade do Padrão (Desvio Padrão Relativo – DPR), para garantir a eficiência do sistema.

4.7.3 Covalidação da metodologia analítica

A determinação do teor de ácido rosmarínico foi avaliada de acordo com as especificações da Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003, da ANVISA (BRASIL, 2003). Foram avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade do padrão, linearidade da amostra,

limite de quantificação e detecção, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

4.7.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela comparação entre os tempos de retenção e pureza do pico de ácido rosmarínico tanto da amostra, quanto do padrão de ácido rosmarínico (Sigma-Aldrich[®], United Kingdom). A fim de se comprovar que o solvente não interferiu na análise, foi realizada uma comparação do padrão de ácido rosmarínico juntamente com o branco, que consistiu de álcool etílico 80% (v/v).

4.7.3.2 Linearidade do padrão

A linearidade do padrão foi realizada a partir de uma triplicata de curva padrão, sendo realizadas em três dias consecutivos. O padrão de ácido rosmarínico foi diluído em uma solução de álcool etílico 80% (v/v). A concentração da solução mãe preparada foi de 0,2 mg/mL e a partir da solução mãe foram realizadas diluições sucessivas, nas concentrações de: 0,1; 0,075; 0,05; 0,025; 0,01 mg/mL.

As amostras do padrão foram filtradas em membranas de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo a líquido. Foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e o coeficiente de correlação linear (r). A partir desses cálculos, o intervalo linear foi determinado.

4.7.3.3 Linearidade da amostra

A linearidade da amostra foi determinada a partir de uma triplicata de curva de ácido rosmarínico presente no extrato etanólico bruto de *R. officinalis* e *O. vulgare*, sendo realizadas em 3 dias consecutivos. A amostra foi diluída em uma solução de álcool etílico 80% (v/v). A concentração da solução mãe de *R. officinalis* foi de 120 mg/mL e a partir desta solução mãe foram realizadas diluições sucessivas, nas concentrações de: 12; 10; 8; 6; 4 mg/mL. Já a concentração da solução mãe de *O. vulgare* foi de 40 mg/mL e a partir desta solução mãe foram realizadas diluições sucessivas, nas concentrações de: 35; 30; 25; 20; 15 mg/mL.

As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo a líquido. Foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e o

coeficiente de correlação linear (r). A partir desses cálculos, o intervalo linear foi determinado.

4.7.3.4 Limite de detecção e quantificação

A curva padrão de ácido rosmarínico foi obtida em triplicata e calculou-se o limite de detecção e de quantificação, pelas Equações 9 e 10, respectivamente:

$$LD = DP_a \times 3 / IC \quad (9),$$

$$LQ = DP_a \times 10 / IC \quad (10),$$

em que: DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo Y de 3 curvas de calibração; IC = inclinação da curva de calibração

4.7.3.5 Precisão

Foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Para a repetibilidade foram realizadas seis determinações a 100% da concentração do teste. Assim, 27,2 mg foram dissolvidas em 10 mL de álcool etílico 80% (v/v). Foi calculado o coeficiente de variação (CV) destas seis determinações.

Para a precisão intermediária foram realizadas seis determinações a 100% da concentração do teste. Foi calculado o coeficiente de variação entre os doze resultados (primeiro e segundo dia). O valor máximo aceitável do coeficiente de variação foi de 5%.

A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV), de acordo com a Equação 11:

$$CV (\%) = DP \times 100 / CMD \quad (11),$$

em que: DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada

4.7.3.6 Exatidão

O teste de exatidão foi realizado pela metodologia de adição de padrão de ácido rosmarínico, sendo realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento. Ou seja, foram escolhidas três concentrações, 80%, 100% e 120%, todos em triplicata. A exatidão foi calculada pela concentração média, descrita na Equação 12:

$$\text{Exatidão} = \text{Concentração média experimental} \times 100 / \text{Concentração teórica} \quad (12),$$

em que: Concentração média experimental = Concentração recuperada do padrão de ácido rosmarínico; Concentração teórica = Concentração do padrão adicionado

4.7.3.7 Robustez

Foram realizadas pequenas alterações dos parâmetros analíticos, a fim de se avaliar se o método foi confiável durante o uso normal. Os parâmetros avaliados foram: variação na composição da fase móvel (29% A: 71% B e 31% A: 69% B), temperatura da coluna (29 °C e 31 °C) e vazão da fase móvel (0,49 e 0,51 mL/min). Os resultados foram analisados e comparados com as condições normais do método utilizando o coeficiente de variação (CV).

4.7.4 Quantificação do teor de ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*

Para a quantificação do teor de ácido rosmarínico no extrato etanólico bruto de *R. officinalis*, 8,5 mg foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico 80% (v/v). Deixou-se em banho de ultrassom por 20 min. As amostras foram analisadas em CLAE de acordo com as condições descritas no item 4.7.2. O teor de ácido rosmarínico foi calculado de acordo com a Equação 13:

$$\text{Teor (\%)} = (C \times FD \times 100) / m \quad (13),$$

em que: C = concentração da solução determinada pela equação da reta da curva padrão (mg/ml); FD = Fator de diluição da amostra; m = massa do extrato (mg)

4.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CAPSAICINA DE *Capsicum chinense* POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.8.1 Sistema cromatográfico

O teor de capsaicina foi determinado de acordo com o sistema cromatográfico descrito no **item 4.7.1**.

4.8.2 Determinação das condições cromatográficas e *system suitability* (adequação do sistema)

Para a determinação do teor de capsaicina foi desenvolvida uma metodologia com as condições cromatográficas descritas a seguir. A coluna cromatográfica utilizada foi RP-18, diâmetro médio da partícula de 5 µm, comprimento e diâmetro interno de 250x4,6 mm, respectivamente (Waters[®] – X-Terra[®]). O volume de injeção estabelecido foi de 20 µL. Como fase móvel empregou-se solvente A – acetonitrila grau HPLC 40% (v/v), solvente B – metanol 30% (v/v), solvente C – água purificada 30% (v/v), com uma vazão isocrática de 0,6 mL/min. O comprimento de onda de detecção foi de 229 nm, com uma varredura de 192 a 780 nm. As temperaturas da coluna e do carrossel das amostras foram mantidas a 30 °C. O tempo de análise da amostra e do padrão foi fixado em 10 min.

De acordo com o FDA (CDER, 1994), foram determinados os parâmetros do *system suitability*: Fator de Cauda (T), Resolução (R), Número de Pratos Teóricos (N) e Repetibilidade do Padrão (Desvio Padrão Relativo – DPR), para garantir a eficiência do sistema.

4.8.3 Validação da metodologia analítica

A determinação do teor de capsaicina foi avaliada de acordo com o **item 4.7.3**.

4.8.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi determinada pela comparação entre os tempos de retenção e pureza do pico de capsaicina tanto da amostra, quanto da capsaicina padrão *USP Reference Standard* (USP 12601, Twenbrook Pkwy, Rockville). O branco foi preparado com álcool etílico 86% (v/v).

4.8.3.2 Linearidade do padrão

Para verificar a linearidade da curva do padrão capsaicina, foram construídas as curvas da amostra em três dias consecutivos. O padrão de capsaicina foi dissolvido em uma solução de álcool etílico 86% (v/v). A concentração da solução mãe preparada foi de 0,2 mg/mL e a partir da solução mãe foram realizadas diluições sucessivas, nas concentrações de: 0,1; 0,075; 0,05; 0,025; 0,01 mg/mL.

As amostras do padrão foram filtradas em membranas de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo a líquido. Foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e o coeficiente de correlação linear (r). A partir desses cálculos, o intervalo linear foi determinado.

4.8.3.3 Linearidade da amostra

Para verificar a linearidade da curva de capsaicina de *Capsicum chinense*, foram construídas as curvas da amostra em três dias consecutivos. A amostra foi dissolvida em uma solução de álcool etílico 86% (v/v). A concentração da solução mãe de *C. chinense* foi de 55 mg/mL e a partir desta solução mãe foi realizado diluições sucessivas, nas concentrações de: 45, 35, 25, 15 mg/mL.

As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm e injetadas no cromatógrafo. Foi realizado o cálculo do coeficiente de variação (CV) entre os pontos da curva e o coeficiente de correlação linear (r). A partir desses cálculos, o intervalo linear foi determinado.

4.8.3.4 Limite de detecção e quantificação

A curva padrão de capsaicina foi determinada em triplicata e calculou-se o limite de detecção e de quantificação, de acordo com as equações 9 e 10 do item 4.7.3.4, já descritos.

4.8.3.5 Precisão

Foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Para a repetibilidade foram feitas seis determinações a 100% da concentração do teste. Assim, 37,0 mg foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico 86% (v/v). Foi calculado o coeficiente de variação (CV) destas seis determinações.

Para a precisão intermediária foram realizadas seis determinações a 100% da concentração do teste. Foi calculado o coeficiente de variação entre os doze resultados (primeiro e segundo dia). A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV), de acordo com a equação 11 do item 4.7.3.5. O valor máximo aceitável do coeficiente de variação é de 5%.

4.8.3.6 Exatidão

O teste de exatidão foi realizado pela metodologia de adição de padrão de capsaicina, sendo realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento. Ou seja, foram escolhidas três concentrações, 80%, 100% e 120% e os testes foram realizados em triplicata. A exatidão é calculada pela concentração média, descrita na equação 12 do item 4.7.3.6.

4.8.3.7 Robustez

Foram realizadas pequenas alterações dos parâmetros analíticos, a fim de se avaliar se o método foi confiável durante o uso normal. Os parâmetros avaliados foram: variação na composição da fase móvel (40% A; 29% B; 31% C e 40% A; 31% B; 29% C), temperatura da coluna (29 °C e 31 °C) e vazão da fase móvel (0,59 e 0,61 mL/min). Os resultados foram analisados e comparados com as condições normais do método utilizando o coeficiente de variação (CV).

4.8.4 Quantificação do teor de capsaicina no extrato etanólico bruto de *Capsicum chinense*

Para a quantificação do teor de capsaicina no EEB de *C. chinense*, 36,9 mg foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico 86% (v/v). Deixou-se em banho de ultrassom por 20 min. As amostras foram analisadas em CLAE de acordo com as condições descritas no **item 4.8.2**. O teor de capsaicina foi calculado de acordo com a Equação 13, descrita no **item 4.7.4**.

4.9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTO (EEB), FRAÇÕES E PADRÕES DE *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Capsicum chinense* FRENTE A BACTÉRIAS E FUNGOS PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Os extratos etanólicos brutos, suas frações e o padrão de ácido rosmarínico (*R. officinalis* e *O. vulgare*) e capsaicina (*C. chinense*) foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo, descrito pelo *Clinical and Laboratory Standart Institute* (CLSI), para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em condições de aerobiose. Foram realizados testes de susceptibilidade para bactérias (CLSI, 2009) e testes para susceptibilidade de leveduras (CLSI, 2008a) e fungos filamentosos (CLSI, 2008b).

Os micro-organismos utilizados para os testes de susceptibilidade estão apresentados na Tabela 1. Os isolados clínicos foram fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da UFG. O isolado alimentar *Listeria monocytogenes* 24AJ3 foi fornecido pelo Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos da Universidade de São Paulo (USP) – Pirassununga. Os demais isolados alimentares foram obtidos em trabalhos anteriores realizados pelo Laboratório de Pesquisa em Controle de Qualidade de Alimentos e Medicamentos (LPCQAM) (dados não publicados).

Tabela 1 - Micro-organismos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos etanólicos bruto e suas frações, bem como padrão de ácido rosmarínico e capsaicina.

Bactérias
Bactérias Gram-positivas
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
<i>Listeria innocua</i> (CT) ATCC 33090
<i>Listeria innocua</i> (isolado alimentar) DF3A-MC2-LS2
<i>Listeria innocua</i> (isolado alimentar) QMG-13
<i>Listeria innocua</i> (isolado alimentar) QMAC-11
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644
<i>Listeria monocytogenes</i> (isolado alimentar) 24AJ3
<i>Listeria monocytogenes</i> (isolado alimentar) QMAC-1
<i>Listeria monocytogenes</i> (isolado alimentar) QMAC-7
<i>Listeria monocytogenes</i> (isolado alimentar) QMG-10
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2B-10-Sa5
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2B-32-Sa3
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2B-8-Sa3
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2B-9-Sa1
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2A-MC1-Sa1
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2A-MC2-Sa1
<i>Staphylococcus aureus</i> (isolado alimentar) DF2A-MC3-Sa3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
Bactérias Gram-negativas
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048
<i>Enterobacter cloacae</i> (isolado clínico) HMA:FTA 502
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sorotipo <i>Abony</i> NCTC 6017
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> ATCC 10749
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 14028
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> (CT) ATCC 19430
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> ATCC 10708
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
Fungos
Fungos leveduriformes
<i>Candida albicans</i> (isolado clínico) 63U
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019

Tabela 1 – Continuação.

<i>Candida parapsilosis</i> (isolado clínico) 86U
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707
<i>Criptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ATCC 28957
<i>Criptococcus neoformans</i> var. <i>gatti</i> (isolado clínico) L3
Fungos filamentosos
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 11480
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28189

4.9.1 Reativação dos micro-organismos

Para a determinação da atividade antimicrobiana, os micro-organismos foram cultivados em caldo Casoy (Himedia, Índia), por 18-24 h a 35 ± 2 °C e, em seguida, transferidos para ágar Casoy (Himedia, Índia), por 18-24 h a 35 ± 2 °C.

As cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram cultivadas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI – Oxoid LTDA, Basingstoke, Hampshire, England) por 18-24 h a 35 ± 2 °C e, em seguida, transferidas para ágar Infusão Cérebro Coração (BHI – Oxoid LTDA, Basingstoke, Hampshire, England), por 18-24 h a 35 ± 2 °C.

Os fungos foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia, Índia), a 25°C, por 24-48 h (leveduras) e 48-72 h para outras espécies de fungos.

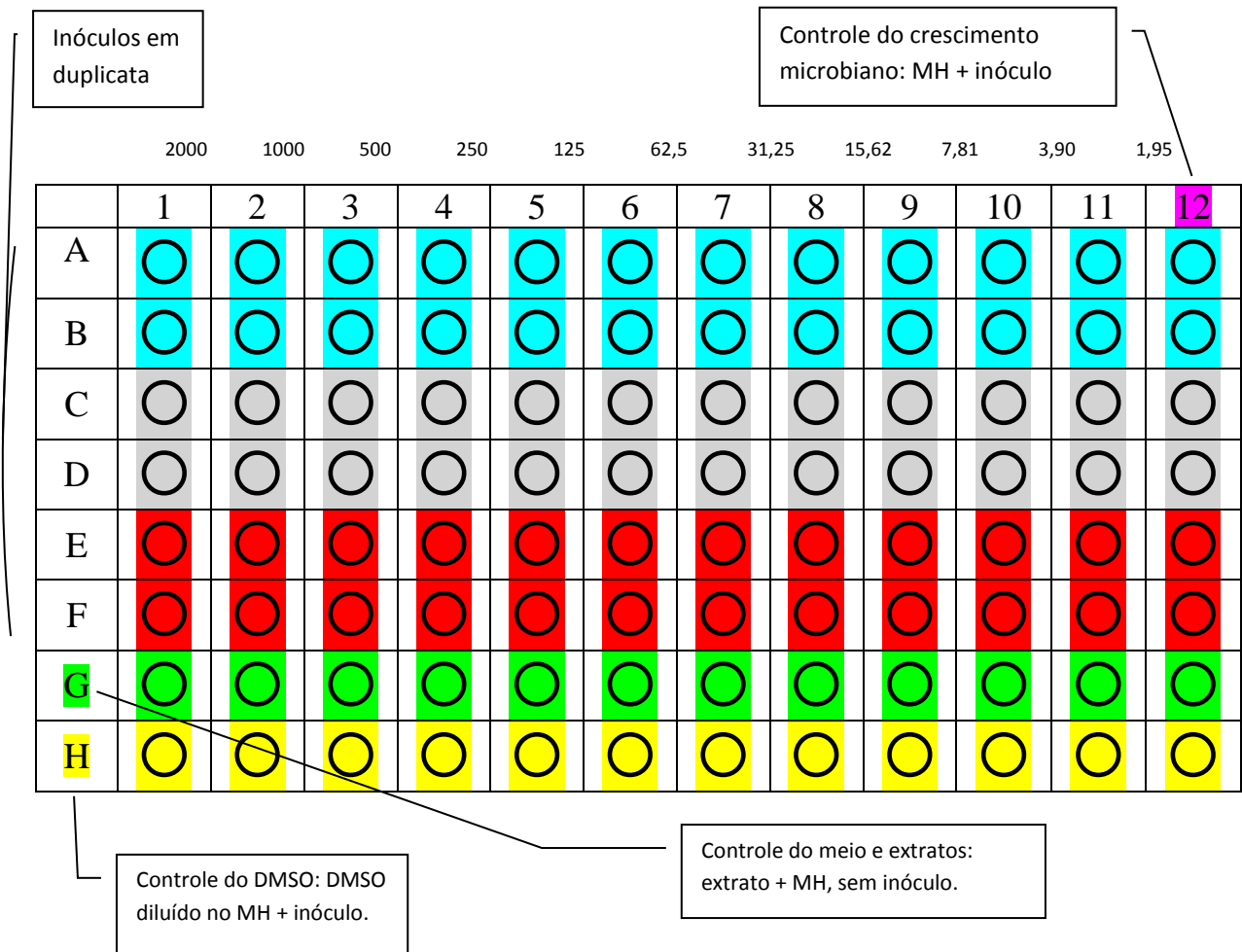
4.9.2 Determinação da CIM para bactérias

Para o preparo das amostras (extrato etanólico bruto, frações e padrões), pesou-se 20 mg em tubo de ensaio estéril e adicionou-se 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO P.A., Vetec, Rio de Janeiro) e agitou-se até completa solubilização. Em seguida, adicionou-se 9 mL de caldo Müeller Hinton (Himedia, Índia) duas vezes concentrado, e homogeneizou-se. Para as espécies de *Listeria*, utilizou-se o caldo Mueller Hinton cátion ajustado 2 (Fluka Analytical 90922, Índia) para o preparo da amostra (CLSI, 2005).

Os ensaios foram conduzidos em placas de microtitulação contendo 96 poços em fundo “U” (Figura 1). Inicialmente, distribuiu-se 100 µL de caldo Müeller Hinton duplamente concentrado da coluna 2 à coluna 12. Em seguida, adicionou-se 200 µL da amostra preparada, da linha A até a H, com exceção da linha G, obtendo a concentração de 2000 µL, na coluna 1. Retirou-se 100 µL da coluna 1 utilizando pipeta multicanal (Discovery Comfort CE IVD Autoclavable HT) e realizou-se diluições seriadas até a coluna 11. Para *L. monocytogenes* e *L.*

innocua, além do procedimento descrito, antes de se colocar o inóculo, adicionou-se sangue de cavalo lisado (2,5-5% v/v) (CLSI, 2005).

Figura 1 - Esquema da placa de microtitulação contendo 96 poços em fundo “U”, após as diluições no ensaio de determinação da CIM para bactérias. A concentração inicial é de 2000 µg/mL para bactérias e 1000 µg/mL para fungos.



Fonte: Paula (2011).

Para o preparo do inóculo, uma alçada da cultura bacteriana foi adicionada a um tubo contendo 3 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,85% (p/v), homogeneizou-se em agitador de tubos por 30 segundos e leu-se em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm de forma que o intervalo de transmitância ficasse entre 79,4% e 83,2%. Em seguida, retirou-se 500 µL deste e colocou-se em um tubo contendo 4,5 mL solução de NaCl 0,85% (diluição 1:10), agitou-se e obteve-se uma concentração de células de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Adicionou-se 5 µL desse inóculo a cada poço, em duplicata,

com a exceção da linha “H” (controle negativo). A concentração final de células bacterianas foi de 10^4 UFC/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 18–24 h.

Para a leitura da CIM, após o período de incubação foi adicionado aos orifícios 20 µL de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC) (Vetec, Rio de Janeiro) a 0,5%. As placas foram reincubadas em estufa a 35 °C por 30 min. A coloração avermelhada, ou rosada, foi considerada como presença de crescimento microbiano. Foi considerada CIM a menor concentração da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano.

Os ensaios foram realizados em duplicata, cada um com duas replicatas.

4.9.3 Determinação da CIM para fungos

O caldo Roswell Park Memorial Institute (RPMI), utilizado para determinação da CIM em fungos, foi preparado, adicionando-se 10,4 g de RPMI 1640 (Himedia, Índia), 34,53 g de Tampão MOPS – ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico (M1254 – Sigma Aldrich, Taiwan), o volume completado para 1000 mL com água destilada e o pH ajustado para neutro, com adição de solução de NaOH, se a solução estivesse ácida, ou HCl, se a solução estivesse básica.

Para o preparo das amostras (extrato etanólico bruto, frações e padrões), pesou-se 20 mg em tubo de ensaio estéril e adicionou-se 1 mL de DMSO e agitou-se até completa solubilização. Em seguida, adicionou-se 9 mL de caldo RPMI e homogeneizou-se.

Os ensaios foram conduzidos em placas de microtitulação contendo 96 poços em fundo “U”. Inicialmente, distribuiu-se 100 µL de caldo RPMI da coluna 2 à coluna 12. Em seguida, adicionou-se 200 µL da amostra preparada, da linha A até a H, com exceção da linha G, obtendo a concentração de 1000 µL, na coluna 1. Retirou-se 100 µL da coluna 1 utilizando pipeta multicanal e realizou-se diluições seriadas até a coluna 11.

Para o preparo do inóculo, uma alçada da cultura fúngica foi adicionada a um tubo contendo 3 mL de solução de cloreto de sódio 0,85% (p/v), homogeneizou-se em agitador de tubos por 30 segundos e leu-se em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530 nm, de forma que o intervalo de transmitância ficasse entre 79,4% e 83,2%. Foi feita uma diluição 1:50 em meio RPMI e, em seguida, uma diluição 1:20 em meio RPMI, com o objetivo de se obter concentração de células entre $1-5 \times 10^3$ UFC/mL. Adicionou-se 100 µL do inóculo a cada poço, em duplicata, com a exceção da linha “H” (controle negativo). Desta forma, a concentração das amostras foi reduzida à metade e obteve-se uma concentração final do

inóculo de aproximadamente $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 25°C por 24-48 h (leveduras) e 48-72 h para outras espécies de fungos.

O crescimento fúngico foi verificado visualmente, contra a luz, sendo que a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos fungos foi considerada como CIM.

Os ensaios foram realizados uma única vez, com duas replicatas.

4.9.4 Controles

Para verificar se a inibição do crescimento microbiano não era causada pelo DMSO, na linha “G” foi feito controle com o DMSO a 10 %, adicionado de caldo MH (para bactérias) ou caldo RPMI (para fungos). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, e adicionou-se o inóculo microbiano.

Para verificar a possibilidade de contaminação da amostra (extrato etanólico bruto, frações e padrões), na linha “H” foi realizado um controle apenas com a amostra e os caldos de cultura (MH para bactérias e caldo RPMI para fungos).

Para avaliar a viabilidade dos micro-organismos testados, na coluna 12 foi realizado um controle com o inóculo microbiano e os caldos de cultura (MH para bactérias e RPMI para fungos).

Como controles positivos de antibióticos, foi utilizada gentamicina (Concentração inicial de 2000 µg/mL e final de 1,95 µg/mL), para bactérias Gram-negativas, vancomicina (Concentração inicial de 250 µg/mL e final de 0,24 µg/mL), para bactérias Gram-positivas e ciprofloxacina (Concentração inicial de 2000 µg/mL e final de 1,95 µg/mL) para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, representando um antibiótico de amplo-espectro. O itraconazol (Concentração inicial de 16 µg/mL e final de 0,02 µg/mL) foi utilizado para os fungos.

Os controles foram realizados em todas as placas testadas.

4.9.5 Classificação da atividade antimicrobiana

Para a análise de resultados, tanto da atividade antibacteriana quanto antifúngica, considerou-se boa atividade inibitória, quando o valor de CIM foi menor que 100 µg/mL, atividade inibitória moderada, entre 100-500 µg/mL, atividade inibitória fraca, entre 500-1000 µg/mL, e ausência de atividade inibitória, quando maior que 1000 µg/mL (HOLETZ et al., 2002; AYRES et al., 2008; SOUZA et al., 2014), de acordo com a Tabela 2:

Tabela 2 – Classificação da atividade antimicrobiana, de acordo com a concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com Holetz et al. (2002); Ayres et al. (2008); Souza et al. (2014).

Atividade antimicrobiana	Concentração inibitória mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Atividade boa	<100
Atividade moderada	100 - 500
Atividade fraca	500 - 1000
Inativo	>1000

REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

ABDEL-MASSIH, R.; ABDU, E.; BAYDOUN, E.; DAOUD, Z. Antibacterial activity of the extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Trigonella foenum-graecum* on highly drug-resistant gram negative bacilli. **Journal of Botany**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

ABDEL-WAHHAB, K. G. E.; EL-SHAMY, K. A.; EL-BEIH, N. A. E.; MORCY, F. A.; MANNAA, F. A. E. Protective effect of a natural herb (*Rosmarinus officinalis*) against hepatotoxicity in male albino rats. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 1, p. 9-17, 2011.

ABEDINI, A.; ROUMY, V.; MAHIEUX, S.; BIABIANY, M.; STANDAERT-VITSE, A.; RIVIÈRE, C.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; NEUT, C.; HENNEBELLE, T. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). **Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 11p. 2013.

ADEDEJI, O.; AJUWON, O. Y.; BABAWALE, O. O. Foliar epidermal studies, organographic distribution and importance of trichomes in the family Solanaceae. **International Journal of Botany**, v. 3, n. 3, p. 276-282, 2007.

AFONSO, M. S.; SILVA, A. M. O.; CARVALHO, E. B. T.; RIVELLI, D. P.; BARROS, S. B. M.; ROGERO, M. M.; LOTTENBERG, A. M.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. Phenolic compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, n. 19, p. 1-9, 2013.

AGIOMYRGIANAKIA, A.; DAISA, P. Simultaneous determination of phenolic compounds and triterpenic acids in oregano growing wild in Greece by ³¹P NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, p. 739-748, 2012.

ALKURD, R. A.; TAKRURI, H. R.; AL-SAYYED, H. Tannin contents of selected plants used in Jordan. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, v. 4, p. 265-274, 2008.

ALMEIDA, D. M.; CHAVES, L. L.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; SOUSA, O. V. Total flavonoid and essential oil contents in samples of *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 91, n. 4, p. 170-175, 2010.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R. P.; MENCHERINI, T.; LOGGIA, R. D.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1718-1723, 2007.

ALVES, M. S. M.; MENDES, P. C.; VIEIRA, J. G. P.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; JÚNIOR, J. O. C. S. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., Bignoniaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 215-221, 2010.

AMIN, A.; HAMZA A. A. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Sciences**, v. 77, p. 266–278, 2005.

AMRUTHRAJ, N. J.; RAJ, J. P. P.; LEBEL, L. A. Polar aprotic extraction of capsaicinoids from *Capsicum chinense* Bhut Jolokia fruit for antimicrobial activity. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 12, p. 959-964, 2013.

ARAÚJO, A. A. S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.

ARAÚJO, N. R. R. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral**. 100p. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará. Belém (PA), Belém, 2010.

ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJÍA, E. G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 54, n. 1, p. 100-111, 2004.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGONDI, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 5, p. 177-186, 2011.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BAE, H.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JIFON, J.; PATIL, B. S. Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1912–1918, 2012.

BAKIREL, T.; BAKIREL, U.; KELES, O. U.; ULGEN, S. G.; YARDIBI, H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 64–73, 2008.

BARNI, S. T.; CECHINEL-FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pescaprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.

BARROS, L.; HELENO, S. A.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 544–550, 2010.

BASTOS, D. H. M.; RODRIGUES, R. F. O.; FONSECA, A. Incidência de micotoxinas em fitoterápicos: Revisão. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 18, n. 2, p. 107-114, 2000.

BAYOUB, K.; BAIBAI, T.; MOUNTASSIF, D.; RETMANE, A.; SOUKRI, A. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.27, p. 4251-4258, 2010.

BEGUM, A.; SANDHYA, S.; ALI, S. S. A.; VINOD, K. R.; SWAPNA REDDY, BANJI, D. An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 12, n.1, p. 61-73, 2013.

BENINCÁ, J. P.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chemistry**, v. 124, p. 468–475, 2011.

BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G et al. et al. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p.1835-1840, 2010.

BOIX, Y. F.; VICTÓRIO, C. P.; LAGE, C. L. S.; KUSTER, R. M. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* Dc. growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M. G.; ALVES, J. A.; LUCENA, E. M. P. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 656-665, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 5.ed., v. 1. Brasília, DF, 2010.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003, Seção 1, p. 56. 2003. Disponível em: <
http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%A9ticos+e+bioanal%C3%A9ticos.pdf?MOD=AJPERES
 >. Acesso em: 17 de outubro de 2013.

BRAUCHLER, C.; MEIMBERG, H.; HEUBL, G. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Menthae) – Taxonomy, biogeography and conflicts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 501-523, 2010.

BRITO-ARGÁEZ, L.; MOGUEL-SALAZAR, F.; ZAMUDIO, F.; GONZÁLEZ-ESTRADA, T.; ISLAS-FLORES, I. Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. **Asian Journal of Biochemistry**, v. 4, n. 3, p. 77-87, 2009.

BUBONJA-SONJE, M.; GIACOMETTI, J.; ABRAM, M. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1821-1827, 2011.

BUSATTA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616, 2007.

CANELAS, V.; COSTA, C. T. Quantitative HPLC analysis of rosmarinic acid in extracts of *Melissa officinalis* and spectrophotometric measurement of their antioxidant activities. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 9, p. 1502-1504, 2007.

CANTO-FLICK, A.; BALAM-UC, E.; BELLO-BELLO, J. J.; LECONA-GUZMAN, C.; SOLIS-MARROQUIN, D.; AVILES-VINAS, S.; GOMEZ-UC, E.; LOPEZ-PUC, G.; SANTANA-BUZZY, N.; IGLESIAS-ANDREU, L. G. Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. **Hortscience**, v. 43, n. 5, p.1344–1349, 2008.

CARVALHO, H. H. C. **Avaliação da atividade antibacteriana de plantas com indicativo etnográfico condimentar sobre contaminantes e inóculos padronizados**. 200p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2004. Disponível em: <

<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/16296/000699704.pdf?sequence=1> >. Acesso em: 10 de setembro de 2014.

CASTILHO, P. C.; SAVLUCHINSKE-FEIO, S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, p. 552-558, 2012.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L. E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J. J.; DELGADO-HERRERA, M. A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae Families used as biological control of insects [Metabolitos secundarios de las familias Annonaceae, Solanaceae y Meliaceae usadas como control biológico de insectos]. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 12, p. 445-462, 2010.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, A. F.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais – metabólitos secundários**. 2. ed. Viçosa – MG: Ed. Visconde do Rio Branco, 2004, 113p.

CASTRO-CONCHA, L. A.; TUYUB-CHE, J.; MOO-MUKUL, A.; VAZQUEZ-FLOTA, F. A.; MIRANDA-HAM, M. L. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

CDER - CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH (U.S. Food and Drug Administration). **Reviewer guidance, validation of chromatographic methods**. Rockville, MD: FDA, 30p., 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>>. Acesso em: 07 de junho de 2013.

CETIN-KARACA, H. **Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens**" University of Kentucky Master's Theses. Paper 652, 2011. Disponível em: <http://uknowledge.uky.edu/gradschool_theses/652>. Acesso em: 14 de agosto de 2014.

CHAKRABORTY, D.; MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, J.; BHATTACHARYA, P. K.; BANDYOPADHYAY, A.; MITRA, A.; GUPTA, K. Antimicrobial activity of leaf extract of *Basilicum polystachyon* (L) Moench. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, p. 744-748, 2007.

CHAN, E. W. C.; KONG, L. Q.; YEE, K. Y.; CHUA, W. Y.; LOO, T. Y. Antioxidant and antibacterial properties of some fresh and dried Labiatae herbs. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 20-27, 2012.

CICHEWICZ R. H.; THORPE. P. A. The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 61-70, 1996.

CHINN, M. S.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; COTTER, J. L. Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 340-345, 2011.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; proposed guideline. CLSI document M45-P (ISBN 1-56238-583-6). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, v. 25, n. 26, p. 27, 2005.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd edn. Approved Standard M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008a.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. 2nd edn. Approved Standard M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008b.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 29, n. 2, 2009.

CORNAGLIA, G. Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 3, p. 209-211, 2009.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; COSTA, L. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAN, E. S.; BRANT, R. S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 80-89, 2010.

CORRÊA, L. R.; COSTA, N. M.; ISHIKAWA, T.; LEMES, R. M. L. Antimicrobial activity evaluation of crude extract of *Capsicum chinense*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 1, 2012.

COUTO, M. E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado – Documentos 157, 2006. Disponível em:

<<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/746066/1/documento157.pdf> >
Acesso em: 10 de setembro de 2014.

COUTO, R. O. **Obtenção e caracterização do extrato seco padronizado da *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae)**. 130p. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás (GO), Goiânia, 2011.

COUTO, R. O.; CONCEICAO, E. C.; CHAUL, L. T.; OLIVEIRA, E.M. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 131, p. 99–105, 2012.

CRISHTI, S.; KALOO, Z. A.; SULTAN, P. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 5, n. 10, p. 170-177, 2013.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DE FALCO, E.; MANCINI, E.; ROSCIGNO, G.; MIGNOLA, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; SENATORE, F. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under different growth conditions. **Molecules**, v. 18, p. 14948-14960, 2013.

DE MARTINO, L.; DE FEO, V.; FORMISANO, C.; MIGNOLA, E.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (Southern Italy). **Molecules**, v. 14, p. 2735-2746, 2009.

DO, T. K. T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). **Journal of Chromatography A**, v. 1325, p. 256– 260, 2014.

DOMENICO, C. I.; COUTINHO, J. P.; GODOY, H. T.; MELO, A. M. T. Caracterização agrônômica e pungência em pimenta de cheiro. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 466-472, 2012.

DREW, B. T.; SYTSMA, K. J. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 5, p. 933–953, 2012.

ENYIUKWU, D. N.; AWURUM, A. N.; ONONUJU, C. C.; NWANERI, J. A. Significance of characterization of secondary metabolites from extracts of higher plants in plant disease management. **International Journal of Advance Agricultural Research**, v. 2, p. 8 – 28, 2014.

EGBUCHA, K. C.; MALGWI, M. M.; UNAMBA, C. I. N. Genetic variability and crop improvement implications in some varieties of *Capsicum* species (family Solanaceae) cultivated in North-East Nigeria. **Research WebPub**, v. 1, n. 4, p. 51-55, 2013.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, v. 110, p. 76–82, 2008.

FARIAS, V. L. **Aumento do rendimento do extrato de pimenta (*Capsicum frutescens* L.): utilização de preparações enzimáticas comerciais**. 154p. 2013. Tese (Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química - Universidade Federal do Ceará(CE), Fortaleza, 2013.

FARMACOPEIA PORTUGUESA VIII. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde, 2005.

FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I.M.; SILVA, M.G.; SANTOS, K.S.C.R.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; CARVALHO, M.C.R.D.; SOARES, L.A.L.; FERNANDES-PEDROSA, M.F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** , v. 14, n. 3, p. 548-555, 2012.

FERRI, P. H. **Química de produtos naturais: métodos gerais**. In: DI STASI L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista. p. 129-156, 1996.

FRESCURA, V. S.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ANDRIOLO, J. L.; TEDESCO, S. B. Compostos fenólicos em extratos de *Rosmarinus Officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 9, n. 17; p. 755-761, 2013.

GAHUNGU, A.; RUGANINTWALI, E.; KARANGWA, E.; ZHANG, X.; MUKUNZI, D. Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum Chinense*) Scotch Bonnet Variety at Red Stage. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 3, p. 211-218, 2011.

GEMEINHOLZER, B.; WINK, M. **Solanaceae: occurrence of secondary compounds versus molecular phylogeny**. In: R. G. van den Berg, G. W. M. Barendse, G. M. van der Weerden, C. Mariani Solanaceae V: Advances in taxonomy and utilization, 15p. 2001.

GENENA, A. K. **Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante.** 179 p. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina(SC), Florianópolis, 2005.

GENENA, A. K.; HENSE, H.; JUNIOR, A. S.; SOUZA, S. M. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G. Plants from Solanaceae family with possible anxiolytic effect reported on 19th century's Brazilian Medical Journal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 772-780, 2011.

GOHARI, A. R.; SAEIDNIA, S.; SHAHVERDI, A. R.; YASSA, N.; MALMIR, M.; MOLLAZADE, K.; NAGHINEJAD, A. R.. Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 3, p. 64-68, 2009.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 74-82, 2011.

GOVINDARAJAN, V. S.; SALZER, U. J. *Capsicum* — production, technology, chemistry, and quality — part II. Processed products, standards, world production and trade. **C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 207-288, 1986.

GREVSEN, K.; FRETTÉ, X. C.; CHRISTENSEN, L. P. Content and composition of volatile terpenes, flavonoids and phenolic acids in greek oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum) at different development stages during cultivation in cool temperate climate. **European Journal of Horticultural Science**, v, 74, n. 5, p. 193–203, 2009.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686–699, 2005.

HASSAN, B. A. R. Medicinal plants (Importance and uses). **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 3, 10 p., 2012.

HELMJA, K.; VAHER, M.; GORBATŠOVA, J.; KALJURAND, M. Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the Solanaceae family by capillary electrophoresis. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 172–186, 2007.

HERNÁNDEZ, A. M.; PRIETO GONZÁLES, E. A. Plantas que contienen polifenoles. **Revista Cubana de Investigaciones Biomedica**, v.18, n. 1, p. 12-14, 1999.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, p. 1027-1031, 2002.

IBARRA, A.; CASES, J.; BILY, A.; HE, K.; BAI, N. ROLLER, M.; COUSSAERT, A.; RIPOLL, C. Importance of extract standardization and *in vitro/ex vivo* assay selection for the evaluation of antioxidant activity of botanicals: a case study on three *Rosmarinus officinalis* L. extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1167-1175, 2010.

KAURINOVIC, B.; POPOVIC, M.; VLAISAVLJEVIC S.; TRIVIC, S. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts. **Molecules**, v. 16, p. 7401-7414, 2011.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition: an International Review Journal**, v.2, p. 32–50, 2011.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KWON, Y. I.; VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 107-118, 2006.

LANNES, S. D.; FINGER, F. L.; SCHUELTER, A. R.; CASALI, V. W. D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 266–270, 2007.

LEE, C.; CHEN, L.; CHANG, T.; KE, W.; LO, Y.; WANG, C. The correlation between skin care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**, v. 124, p. 833-841, 2011.

LICINA, B. Z.; OLGICA D. STEFANOVIC, O. D.; SAVA M. VASIC, S. M.; RADOJEVIC, I. D.; MILAN S. DEKIC, M. S.; COMIC, L. R. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. **Food Control**, v. 33, p. 498 – 504, 2013.

LIMA, A. P. L.; GROSSO, E. S. B.; FERREIRA, G.; ANDRADE, M. Efeito antimicrobiano do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um hospital escola do sul de minas. **Revista Ciências em Saúde**, v.4, n.2, p. 1-9, 2014.

LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J. Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* (Lamiaceae) from Austria. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 106–113, 2013.

MACHADO, D. G.; CUNHA, M. P.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; COLLA, A. R.; GRANDO, J.; BROCARD, P. S.; BETTIO, L. E. B.; DALMARCO, J. B.; RIAL, D.; PREDIGER, R. D.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES, A. L. S. *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 158–169, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. **Cell structure/function in brock biology of microorganisms**, 11 ed., Pearson, Prentice Hall, (Upper Saddle River, NJ), p. 55-100, 2006.

MAY, A.; SUGUINO, E.; MARTINS, A. N.; BARATA, L. E. S.; PINHEIRO, M. Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e internavo entre cortes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 195-200, 2010.

MAMEDOV, N. Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 1, n. 8, p. 1-2, 2012.

MARIN, M.; KOKO, V.; DULETIĆ-LAUŠEVIĆ, S.; MARIN, P.D.; RANČIĆ, D.; DAJIC-STEVANOVIC Z. Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: morphology, stereology and histochemistry. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 378–382, 2006.

MARTINEZ, A. L.; GONZALEZ-TRUJANO, M. E.; CHAVEZ, M.; PELLICER, F. Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, p. 28–34, 2012.

MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; LOIZZO, M. R.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; CINDIO, B.; HOUGHTON, P. J.; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, 553–560, 2009.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.3; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pelúcida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MEYERS, M. Oregano and marjoram: an Herb Society of America guide to the genus *Origanum*. **The Herb Society of America**, Kirtland, USA p. 8–9, 2005. Disponível em: <<http://www.herbsociety.org/factsheets/Oregano%20and%20Majoram.pdf>>. Acesso em: 12 de outubro de 2014.

MOGHTADER, M.; SALARI, H.; FARAHMAND, A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. **Journal of Ecology and the Natural Environment**, v. 3, n. 6, p. 210-214, 2011.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v. 72, p. 137-147, 1987a.

MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for bichemically defining tannins. **Oecologia**, v. 72, p. 148-156, 1987b.

MOLES, A. T.; PECO, B.; WALLIS, I. R. et al. Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? **New Phytologist**, v. 198, p. 252-263, 2013.

MOLINA-SALINAS, G. M.; LUIS MANUEL PENA-RODRIGUEZ, L. M.; MATA-CARDENAS, B. D.; ESCALANTE-EROSA, F.; GONZALEZ-HERNANDEZ, S.; DE LA CRUZ, V. M. T.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H. G.; SAID-FERNANDEZ, S. *Flourensia cernua*: Hexane extracts a very active mycobactericidal fraction from an inactive leaf decoction against pansensitive and panresistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

MOLINA-TORRES, J.; GARCIA-CHAVEZ, A.; RAMIREZ-CHAVEZ, E.. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 241–248, 1999.

MORAES, C. S. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. P.; CONCEIÇÃO, E. C. Characterization and quality control of *Ocimum gratissimum* L. leaf powder and development of a standardized ethanolic extract. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 10, p. 3256-3258, 2011.

MORENO, S., SCHEYER, T., ROMANO, C. S., VOJNOV, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, v. 40, p. 223-231, 2006.

MUCHUWETI, M.; KATIVU, E.; MUPURE, C. H.; CHIDEWE, C.; NDHLALA, A. R.; BENHURA, M. A. N. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. **American Journal of Food Technology**, v. 2, n. 5, p. 414-420, 2007.

MULINACCI, N.; INNOCENTI, M.; BELLUMORIA, M.; GIACCHERINIA, C.; MARTINIB, V.; MICHELOZZI, M. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. **Talanta**, v. 85, p. 167-176, 2011.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NCUBE, B.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 81-89, 2012.

NELSON, A. C.; KURSAR, T. A. Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. **Chemoecology**, v. 9, p. 81-92, 1999.

NGO, S. N. T.; WILLIAMS, D. B.; HEAD, R. J. Rosemary and cancer prevention: preclinical perspectives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n.10, p. 946-954, 2011.

NWOKEM, C. O.; AGBAJI, E.B.; KAGBU, J. A.; EKANEM E.J. New determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. **York Science Journal**, v. 3, n. 9, p. 17-21, 2010.

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

PANKUCH, G. A.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Susceptibilities of 428 Gram-positive and -negative anaerobic bacteria to Bay y3118 compared with their susceptibilities to ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole, piperacillin, piperacillin-tazobactam, and cefoxitin. **Antimicroblal Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 8, p. 1649-1654, 1993.

PAULA, J. A. M. **Fitoquímica e atividades biológicas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. *Landrum* (Myrtaceae)**. 248 p. 2011. Tese (Doutorado em Biologia). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás (GO), Goiânia, 2011.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants usage. **Pharmacognosy Review**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PINO, J.; SAURI-DUCH, E.; MARBOT, R. Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. **Food Chemistry**, v. 94 p. 394–398, 2006.

PINO, J.; GONZALEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURION-YAH, A. R.; TRUJILLO-AGUIRRE, J.; LATOURNERIE-MORENO, L.; SAURI-DUCH, E. Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1682–1686, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PRATHYUSHA, P.; SUBRAMANIAN, M. S.; NISHA, M. C.; SANTHANAKRISHNAN, R.; SEENA, M. S. Pharmacognostical and phytochemical studies on *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Anciente Science of Life**, v. 29, n. 2, p. 17-23, 2009.

RADUŠIENĖ, J.; IVANAUSKAS, L.; JANULIS, V.; JAKŠTAS, V. Composition and variability of phenolic compounds in *Origanum vulgare* from Lithuania. **Biologija**, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2008.

REBOUÇAS, T. N. H.; VALVERDE, R. M. V.; TEIXEIRA, H. L. Bromatologia da pimenta malagueta *in natura* e processada em conserva. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 163-165, 2013.

RIBEIRO, D. S.; SIQUEIRA, F. G.; VELOZO, E. S.; GUIMARÃES, A. G. Evaluation rosemary essential oil in the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* in coalho cheese. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2013.

RIGANO, M. M.; GUZMAN, G.; WALMSLEY, A. M.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. Production of pharmaceutical proteins in *Solanaceae*. **Food Crops International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 2753-2773, 2013.

RODRIGUEZ, D. J.; ANGULO-SANCHEZ, J. L.; HERNANDEZ-CASTILLO, F. D. **Naturally Occurring Bioactive Compounds**. Cap. 14: An overview of the antimicrobial properties of Mexican medicinal plants. Ed. Rai and Carpinella, p. 325-377, 2006.

ROLIM, A.; MACIEL, C. P. M.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; SALGADO-SANTOS, I. M. N.; VELASCO, M. V. R.. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benthham (Olacaceae) Commercial Extract. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1015-1019, 2005.

ROŽMAN, T.; JERŠEK, B. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. **Acta agriculturae Slovenica**, v. 93, n.1, p.51–58, 2009.

SANATOMBI K.; SHARMA, G. J. Capsaicin content and pungency of difererent *Capsicum* spp. cultivars. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 36, n. 2, p. 89-90, 2008.

SANTOS, M. M. P. **Atividade Antimicrobiana in Vitro de Extratos Vegetais das Espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum*, e de Análogos Sintéticos da Capsaicina, Frente aos Microrganismos da Cavidade Oral**. 86p. 2010. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (RJ), Campos dos Goytacazes, 2010.

SCHNEID, I.; VOLOSKI, F.; FREITAS, P.; CHIM, J.; MACHADO, M.; GANDRA, E. **Comparação do potencial antimicrobiano de extratos vegetais de alecrim, estragão e orégano com antibióticos de uso terapêutico**. In: XX Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas (CIC), 2011.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7749–7759, 2005.

SHAN, B.; CAI, Y.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 112–119, 2007.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The Bacterial Cell Envelope. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**. v. 2, 16 p., 2010.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 75p. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2010.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, N.; ALVES, S.; GONÇALVES, A.; AMARAL, J. S.; POETA, P. Antimicrobial activity of essential oils from mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 19, n. 6, p. 503-510, 2013.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 1, p. 9-19, 2007.

SOUZA, A. M.; ARMSTRONG, L.; MERINO, F. J. Z.; COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; DUARTE, M. R.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. In vitro effects of *Eugenia pyriformis* Cambess., Mirtaceae: antimicrobial activity and synergistic interactions with Vancomycin and Fluconazole. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 8, n. 35, p. 862 – 867, 2014.

STANOJKOVIĆ, T.; KOLUNDŽIJA, B.; ĆIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; NIKOLIĆ, D.; KUNDAKOVIĆ, T. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Satureja kitaibelii* wierz. Ex *heuff* (Lamiaceae). **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 8, n. 2, p. 845 – 854, 2013.

SULTANBAWA, Y. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances Plant antimicrobials in food applications: Minireview, in Méndez-Vilas. **Communicating current research and technological advances**, Badajoz, Spain: Formatex Research Center, p. 1084 – 1093, 2011.

TAVASSOLI, S.; DJOMEH, Z. E. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of methanol extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Global Veterinaria**, v. 7, n. 4, p. 337-341, 2011.

TSUCHIYA, H. Biphasic membrane effects of capsaicin, an active component in *Capsicum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 295–299, 2001.

TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; BONESI, M.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; MENICHINI, F.; LOIZZO, M. R. Antioxidant and hypoglycaemic activities and their relationship to phytochemicals in *Capsicum annuum* cultivars during fruit development. **Food Science and Technology**, v. 53, p. 370-377, 2013.

VATS, S. Antioxidant activity of *Clitorea ternatea* L. and *Origanum vulgare* L.: A comparative analysis. **Researcher**, v. 6, n. 11, p. 56-58, 2014.

VAZ, A. P. A. **Série Plantas Mediciniais, Condimentares e Aromáticas**. Embrapa Pantanal, Embrapa Transferência de Tecnologia - Corumbá (MS), v. 67, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/FOL104.pdf>>. Acesso em: 11 de novembro de 2013.

VENTURA-MARTÍNEZ, R.; RIVERO-OSORNO, O.; GÓMEZ, C.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1528-1532, 2011.

VERA-GUZMÁN, A. M.; CHÁVEZ-SERVIA, J. L.; CARRILLO-RODRÍGUEZ, J. C.; LÓPEZ, M. G. Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, Mexico. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. 4, p. 578-585, 2011.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 621–629, 2004.

WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) Using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpb-rbcl* spacer region and nuclear *waxy* introns **International Journal Of Plant Sciences**, v. 162, n. 6, p. 1409–1418, 2001.

WEERAKKODY, N. S.; CAFFIN, N.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 21, p. 1408–1414, 2010.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. The international pharmacopoeia, 3rd ed. Geneva, World Health Organization. Vol. 3: Quality specifications, 1988.

ZANELLA, C. A.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; ROMAN, S. S. The effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) in animal models of memory. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 389-397, 2012.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3144-3152, 2010.

ZEYREK, F. Y.; OGUZ, E. In vitro activity of capsaicin against *Helicobacter pylori*. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 125-127, 2005.

ZGÓRKA, G.; GŁOWNIAK, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 79–87, 2001.

ZHUANG, Y.; CHEN, L.; SUN, L.; CAO, J. Bioactive characteristics and antioxidant activities of nine peppers. **Journal of Functional Foods**, v. 4, p.331 –338, 2012.

ZIMMER, A. R.; LEONARDIA, B.; MIRONA, D.; SCHAPOVALA, E.; OLIVEIRA, J. R.; GOSMANNA, G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 228–233, 2012.

ŽIŽOVIC, I.; MIŠIĆ, D.; AŠANIN, R.; IVANOVIĆ, J. Antibacterial activity of essential oils of some Lamiaceae family species isolated by different methods. **Zbornik radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu**, v. 19, p. 20-26, 2009.