AVALIAÇÃO DE FILMES ATIVOS INCORPORADOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS NA CONSERVAÇÃO DE SURURU (Mytella falcata)

Thaylanna Pinto de Lima (LIMA, T. P) ¹*; Gustavo Oliveira Everton (EVERTON, G. O.) ¹ **Orientador:** Victor Elias Mouchrek Filho (MOUCHREK FILHO, V. E.) ¹. ¹Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Tecnologia Química, Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleo Essenciais, CEP 65080-805, São Luís, MA, Brasil. *autor. *Correio eletrônico: thaylana190@gmail.com

RESUMO

Os biofilmes possuem um promissor campo de aplicação como conservante de alimentos. Em comparação com as embalagens sintéticas, são materiais de embalagens de alimentos, que possuem vantagens da biodegradabilidade. Neste estudo avaliamos os filmes ativos incorporados com óleos essenciais na conservação de Mytella falcata (sururu). Os materiais vegetais Syzygium aromaticum, Rosmarinus officinalis e Zingiber officinale foram obtidos em São Luís (MA). A extração dos OEs seguiu a tecnica de hidrodestilação. Os constituintes do OE foram identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Os filmes de alginato de sódio foram preparados por casting com adição dos OEs. Para os ensaios antimicrobianos dos filmes in vitro foram utilizadas cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus e cepas isoladas do alimento. As analises antimicrobianas foram realizadas pelo ensaio do Método de Difusão de Disco (MDD), ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A atividade antioxidante dos OEs foram analisadas pelo método de DPPH. Através da CG-EM, foi identificado o eugenol em 52,53% como componente majoritário do OE de S. aromaticum. A atividade antioxidante do OE de S. aromaticum foi obtida com a CE₅₀ de 15,14 mg L⁻¹.De acordo os resultados apresentados com o ensaio de Difusão de Disco o biofilme incorporado com OE de S. aromaticum foi eficiente ao inibir o crescimento bacteriano da Escherichia coli^a (12 mm) e Escherichia colib (14mm) já a Sthaphyloccuss aureusade (14 mm) e Sthaphyloccuss aureus^b (16 mm) já nos resultados Diluição em Caldo A CIM do biofilme incorporado com OE de S. aromaticum em frente às cepas de Escherichia coli^a e Escherichia coli^b foram 99 μg mL⁻¹ e 80 μg mL⁻¹ respectivamente, já a Sthaphyloccuss aureus^a e Sthaphyloccuss aureus^b foram 116 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹ respectivamente.Para a CBM os resultados foram Escherichia coli^a e Escherichia coli^b foram 116 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹ respectivamente, já a Sthaphyloccuss aureus^a e Sthaphyloccuss aureus^b foram 133 µg mL⁻¹ e 100 μg mL⁻¹, obteve-se ação antimicrobiana de S. aromaticum, e não foi observada ação antimicrobiana dos OEs de R. officinalis e Z. officinale.

Palavras-chave: Óleos essenciais; Syzygium aromaticum; Mytella falcata

INTRODUÇÃO

Mytella falcata (sururu) é uma espécie de importância econômica que possui alta demanda de mercado durante todo o ano. Mytella falcata, nos últimos anos, tornou-se uma iguaria muito apreciada pela população nordestina, sendo consumida em diferentes tipos de preparações culinárias. Possui muitos benefícios para a saúde, pois é um alimento com boa digestão, rico em ferro, conteúdo rico em proteínas, carboidratos, ácidos graxos saturados, poli-insaturados, além de que seu consumo frequente que pode prevenir doenças cardiovasculares (SANTOS et al. 2014).

Porém, estes são vistos como alimentos de alto risco, estando amplamente associados a casos de intoxicação e infecção alimentar, ocasionados, na maioria das vezes, por um cozimento insuficiente do alimento ou por contaminação cruzada, sendo uma possível consequência do aumento da poluição ambiental (PEREIRA et al., 2018).

O uso indiscriminado, errôneo e abusivo de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, tem elevado as taxas de resistência aos antibióticos, antifúngicos e antiparasitários, criando organismos multirresistentes, o que limita as opções de tratamento e trazem consequências clínicas e econômicas graves, contribuindo com o aumento da morbimortalidade em humanos e animais (LOUREIRO et al., 2016). A resistência de bactérias patogênicas, como casos de infecção e intoxicação por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em mariscos como o *Mytella falcata* está muito associada à transferência horizontal de plasmídeos de resistência (SHERLEY et al., 2004).

A *Escherichia coli* é uma bactéria patogênica de grande importância em microbiologia de alimentos. Por ser originária do trato intestinal de animais de sangue quente, é reconhecida como indicador de contaminação fecal e consequentemente das condições higiênico-sanitárias de obtenção, processamento e manipulação de alimentos. Por outro lado, *Staphylococcus aureus* é um patógeno humano oportunista de grande importância em diferentes setores, como por exemplo, médico e na indústria de alimentos, em função da sua capacidade de produzir toxinas. Além do frequente envolvimento em casos e surtos de intoxicação alimentar (ANDRE, 2015).

A aplicação de revestimentos com ação antimicrobiana tem sido muito utilizada na redução de microrganismos em alimentos in natura, pois além de conservar as características sensoriais do alimento, garante a segurança alimentar quanto aos perigos biológicos (ALVES 2020).

Os conservantes naturais à base de OEs despertam interesse na busca de plantas. Isso é explicado por que a aplicação de OEs nos alimentos possui três vantagens, que são: prolongação da vida útil nas prateleiras, inibição do desenvolvimento de patógenos alimentares e redução da atividade tóxica (POMBO et al., 2018). Dessa forma, das diversas espécies de plantas com essa finalidade, destaca-se *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia). Pois além de possuir essas características, estes OEs podem ser utilizados como conservantes naturais em pescados.

Pois além de possuir essas características, estes OEs podem ser utilizados como conservantes naturais em pescados. Em suma, considerando a carência de estudos relacionados à conservação de *Mytella falcata* e suas condições higiênico-sanitárias.

OBJETIVOS:

O presente trabalho teve como finalidade avaliar a utilização de Mytella falcata para avaliar a atividade antimicrobiana na aplicação de biofilmes incorporados com OEs de Syzygium aromaticum como agentes conservantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

A coleta *S. aromaticum*, *R. officinalis e Z. officinale* utilizados nesta pesquisa foi realizada no período de outubro a dezembro de 2021 na cidade de São Luís-MA. O material foi transportado ao Laboratório de Pesquisa e Aplicação de Óleos Essenciais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) para armazenamento, de acordo com a metodologia de Matos (2009).

Extração dos OE's

Para a extração de OE, a técnica de hidrodestilação foi realizada com um extrator de vidro Clevenger acoplado a um balão de fundo redondo acoplado a uma manta aquecedora como fonte geradora de calor. Foram utilizados 100g de cada material vegetal, adicionando água destilada (1:10). A hidrodestilação foi realizada a 100°C durante 3 h e o OE extraído foi coletado.

Constituintes químicos

Os constituintes dos OEs foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Para a identificação dos compostos na amostra utilizou-se o programa AMDIS (Automated Mass spectral Deconvolution Mass & Identification System).

Atividade Antioxidante pelo Método DPPH

A atividade antioxidante foi analisada através da capacidade em sequestrar o radical estável DPPH•(2,2-difenil-1-picril-hidrazina), de acordo com Brand-Williams (1995). Com o intuito de determinar a capacidade antioxidante pelo método DPPH do OE utilizouse a metodologia adaptada de Brand-Williams et al. (1995).

Produção das soluções filmogênicas

Os filmes de alginato de sódio foram preparados por casting, tendo como base a metodologia desenvolvida por Zactiti e Kieckbusch (2005). Foram realizadas avaliações subjetivas, considerando os aspectos visuais e táteis para selecionar as formulações mais promissoras. Apenas os filmes que apresentaram homogeneidade (ausência de partículas), continuidade (ausência de rupturas ou regiões quebradiças), flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e manuseio foram selecionados, a fim de não comprometer os resultados das análises posteriores.

Atividade antimicrobiana dos biofilmes in vitro

A técnica de difusão de disco foi realizada segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020) que padroniza os testes de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão. Os valores dos halos de inibição foram expressos em médias. O ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínimo (CBM)

foram realizados empregando-se a técnica de diluição em caldo, proposta pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos dos OEs são importantes não apenas para determinação da qualidade, como também para o controle da sua pureza. Os resultados para *S. aromaticum*, são apresentados a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos do OE de Syzygium aromaticum

Parâmetros Físico-químicos	OE Syzygium aromaticum
Densidade (g/mL)	0,9650
Índice de refração (ND 25°)	1,522
Solubilidade em álcool a 90% (v/v)	1:2
Cor	Incolor
Aparência	Límpido
Rendimento (m/m) (%)	2,64

A qualidade dos OEs depende de vários parâmetros, como índice de refração, solubilidade em diferentes solventes orgânicos, densidade, etc., que são utilizados para avaliar a qualidade dos materiais vegetais, além de controlar a identidade e pureza do OE.

Caracterização química do OE de Syzygium aromaticum.

As características químicas do OE obtidas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas (CG-EM) desse estudo nos mostra a presença dos constituintes apresentados a seguir (Tabela 2).

Tabela 2-Análises químicas do OE de Syzygium aromaticum

¹ Pico	² Tr (min)	Substância identificada	Teor (%)
1	27,40	Eugenol	52,53
2	27,99	Copaeno	2,05
3	29,47	Cariofileno	37,25
4	30,57	Humuleno	4,11
5	32,94	Acetato de eugenila	4,05

O alto teor revelado na Tabela 2 de eugenol com 52,53% confirma como o componente majoritário do óleo essencial, foram identificados e quantificados outros 4 constituintes. Foram estes o cariofileno com 37,25%, humuleno (4,11%), acetato de eugenila (4,05%) e copaeno (2,05%). Embora o OE de *Syzygium aromaticum* seja normalmente uma mistura de vários compostos orgânicos o mesmo apresenta um composto majoritário, esse componente é o eugenol.

Atividade Antioxidante

Os resultados dos cálculos dos potenciais antioxidantes de OE de Syzygium aromaticum descritos na Tabela 3, foram interpretados com base na concentração eficiente CE_{50} e CE_{90} , em mg L^{-1} . A mesma apresenta os resultados da capacidade antioxidante do OE.

Tabela 3-Atividade Antioxidante (DPPH) do OE de Syzygium aromaticum

	CE_{50}	CE ₉₀	\mathbb{R}^2
OE	15,14 mg L ⁻¹	44,12 mg L ⁻¹	0,9952

Segundo Sousa et al. (2007), quanto menor o valor de CE₅₀, maior a atividade antioxidante do composto vegetal, pois é necessária uma menor concentração de óleo para reduzir o radical DPPH em 50% manifestando potencial para atividade antioxidante. Os resultados para o OE de *Syzygium aromaticum* são satisfatórios, ilustrando que os dados apresentados neste trabalho trazem outra perspectiva para o uso de produtos naturais biotecnológicos em aplicações de tratamento oxidativo

Atividade antimicrobiana dos biofilmes

De acordo os resultados apresentados na Tabela 4, com o ensaio de Difusão de Disco, foi possível obter os dados referentes aos diâmetros médios dos halos de inibição (mm), concentração inibitória mínima (µg mL⁻¹), concentração bactericida mínima (µg mL⁻¹). Não foi observada ação antimicrobiana dos OEs de *R. officinalis e Z. officinale*.

Tabela 4-Análise antimicrobiana de biofilmes contendo OE de *S. aromaticum* frente estirpes microbianas isoladas de *Mytella falcata* e cepas padrões em modelo in vitro

Espécie	DHI	CIM	СВМ
Escherichia coli ^a	12,00	99,00	116,00
Escherichia coli ^b	14,00	80,00	100,00
Sthaphyloccuss aureus ^a	14,00	116,00	133,00
Sthaphyloccuss aureus ^b	16,00	100,00	100,00

Nota: DHI- diâmetros médios dos halos de inibição (mm); CIM- concentração inibitória mínima (μg mL⁻¹); CBM- concentração bactericida mínima (μg mL⁻¹); a- cepa isolada de sururu; b-cepa padrão ATCC

Conforme os critérios estabelecidos por Moreira et al., (2005), a classificação para sensibilidade de microrganismos frente a ação de produtos naturais, é definida de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado, sendo classificados como resistentes quando o halo de inibição for menor que 8 mm e sensíveis para halos de 9 a 14 mm. Dessa forma, os halos de inibição formados permitem classificar todas as cepas bacterianas como sensíveis frente ao biofilme incorporado com OE de *S. aromaticum*.

O biofilme incorporado com OE de *S. aromaticum* foi eficiente ao inibir o crescimento bacteriano da *Escherichia coli*^a (12 mm) e *Escherichia coli*^b (14mm) já a *Sthaphyloccuss aureus*^ade (14 mm) e *Sthaphyloccuss aureus*^b (16 mm), O halo inibitório

considerado foi a área sem crescimento detectável a olho nu. Através desta observação foi possível observar que houve inibição, uma vez que houve a formação de halo ao redor do disco.

De acordo com Aligiannis et al., (2001), a classificação da atividade antimicrobiana para espécimes vegetais, segundo os resultados da CIM, é considerada de forte inibição: CIM até 500 μg mL⁻¹; inibição moderada: CIM entre 600 e 1000 μg mL⁻¹; e fraca inibição: CIM acima de 1000 μg mL⁻¹ A CIM do biofilme incorporado com OE de *S. aromaticum* em frente às cepas de *Escherichia coli*^a e *Escherichia coli*^b foram 99 μg mL⁻¹ e 80 μg mL⁻¹ respectivamente,já a *Sthaphyloccuss aureus*^a e *Sthaphyloccuss aureus*^b foram 116 μg mL⁻¹ e 100 μg mL⁻¹ respectivamente, já a *Sthaphyloccuss aureus*^a e *Sthaphyloccuss aureus*^a foram 133 μg mL⁻¹ e 100 μg mL⁻¹ respectivamente, já a *Sthaphyloccuss aureus*^a e *Sthaphyloccuss aureus*^b foram 133 μg mL⁻¹ e 100 μg mL⁻¹ respectivamente conforme a Tabela.

Dessa forma com a utilização de biofilmes contendo OE de *S. aromaticum* é uma opção para substituir as embalagens sintéticas e reduzir os danos ambientais causados pelas embalagens sintéticas, mas também um aliado na manutenção das propriedades físico-químicas dos alimentos e na segurança alimentar. Observamos que ocorrem altos resultados positivos, para a saúde humana, como a diminuição e até mesmo a morte de determinadas patologias bactericida.

CONCLUSÕES

A utilização de um procedimento tradicional de extração e a utilização de um óleo essencial de fonte confiável resultou em um óleo essencial com características físicas e químicas esperadas se tratando de tal espécie. A técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas se mostrou eficaz para a identificação dos componentes do óleo essencial. A identificação do eugenol como componente majoritário justifica o potencial antibacteriano do óleo, e ainda a sua atividade antioxidante satisfatória. Além de vários outros possíveis benefícios que podem ser analisados através de estudos futuros. Os resultados apontam a eficiência da atuação do biofilme incorporado com óleo essencial de *S. aromaticum* como um antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Anis et al. Antimicrobial activity of *Syzygium aromaticum* oil and its potential in the treatment of urogenital infections. Formatex [Internet], p. 865-871, 2013.

ALIGIANNIS N, KALPOUTZAKIS E, MITAKU S & CHINOU IB. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. **Journal of agricultural and food chemistry**, 49(9), 4168-4170.

ARMANDO, J.; POMBEIRO, Latourrete O. Técnicas e operações unitárias em química laboratorial. 2003.

BARBOZA, J. N. et al. **Potencial anti-inflamatório e perfil antioxidante do eugenol**: Uma revisão. 2018.

BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do *OE* de folhas de Alpinia zerumbet (Pers.) BL Burtt & RM Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 48-56, 2010.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, 28(1), 25-30.

- BARRETO, Norma Suely Evangelista et al. Presença de enteropatógenos resistentes a antimicrobianos em ostras e sururus da Baía do Iguape, Maragogipe (Bahia). Revista Acadêmica Ciência Animal, v. 12, n. 1, p. 25-34, 2014.
- BALDISSEROTTO, B., PARODI, T. V., & STEVENS, E. D. Lack of postexposure analgesic efficacy of low concentrations of eugenol in zebrafish. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, 2017.
- CUTTER, Catherine Nettles. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. **Meat science**, v. 74, n. 1, p. 131-142, 2006.
- CLSI, EP06-A. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. **Approved Guideline**, CLSI, 2003.
- Campos, M. G., Webby, R. F., Markham, K. R., Mitchell, K. A., & Da Cunha, A. P. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51(3), 742-745.
- DALTRO, Ana Cleusa Santana. Aspectos socioeconômicos e qualidade dos molucos bivalves através do monitoramento microbiológico e genético. 2013.
- DAI, J.P.; ZHAO, X.F.; ZEN, J.; WAN, Q.Y.; YANG, J.C.; LI, W.Z. & LI, K.S. Drugscreening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity. PLoS One, v. 8, n. 4, p. e61026, 2013.
- DARVISHI, E.; OMIDI, M.; BUSHEHRI, A. A. S.; GOLSHANI, A. & SMITH, M. L. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. PloS one, v. 8, n. 10, p. e76028, 2013.
- DAWIDOWICZ, A. L., & OLSZOWY, M. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. **Natural product research**, v. 28, n. 22, p. 1952-1963, 2014.
- DE FREITAS, VANESSA DANIELLE. Atividade antibacteriana do *OE*do cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) frente a *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes e sensíveis a meticilina isolados de cães com otite externa. 2019.
- DERVIS, E.; YURT KILCAR, A.; MEDINE, E. I.; TEKIN, V.; CETKIN, B.; UYGUR, E. & MUFTULER, F. Z. B. In Vitro Incorporation of Radioiodinated Eugenol on Adenocarcinoma Cell Lines (Caco2, MCF7, and PC3). **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 32, n. 3, p. 75-81, 2017.
- DE OLIVEIRA BARROS, Leyla Maria et al. Contaminante fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* comercializada na Praia do Futuro, Fortaleza-Ceará. Revista Ciência Agronômica, v. 36, n. 3, p. 285-289, 2005.
- EL ASBAHANI, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. International journal of pharmaceutics, v. 483, n. 1-2, p. 220-243, 2015.
- FABROWSKI, F. J. Eucaliptus smithii R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil. 2002.

- DA FARMACOPÉIA, Comissão Permanente de Revisão et al. Farmacopéia brasileira. In: **Farmacopéia brasileira**. 1988. p. [516]-[516].
- GOES, Vitor Nascimento et al. Aplicabilidade do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) como potencial fitoterápico na Odontologia: uma revisão da literatura. Research, Society and Development, v. 9, n. 7, p. e645974767-e645974767, 2020.
- GOOUTSIDE.Disponívelem:https://gooutside.com.br/aromaterapia-oleosessenciais/acesso em maio.2022. Horário: 20:58
- HAN, Xianlin et al. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. **Journal of neurochemistry**, v. 82, n. 4, p. 809-818, 2002.
- HAMED, S.F; SADEK, Z.; EDRIS, A. Antioxidant and antimicrobial activities of clove bud essential oil and eugenol nanoparticles in alcohol-free microemulsion. **Journal of oleo science**, v. 61, n. 11, p. 641-648, 2012.
- HERNANDES, Karoline Massari. Avaliação da atividade antifúngica de *OE* 's frente a diferentes espécies de dermatófitos: uma revisão da literatura. 2021.
- JACOBSON, Martin. Glossary of plant derived insect deterrents. CRC Press, 2019.
- JUNIOR, VF Veiga; PINTO, Angelo C. O gênero copaifera L. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.
- KIM, S.S.; OH, O.J.; MIN, H.Y.; PARK, E.J.; KIM, Y.; PARK H.J. & LEE, S.K. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264. 7 cells. **Life sciences**, v. 73, n. 3, p. 337-348, 2003.
- LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE & Roura SI. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, 38(5), 565-570.
- NASCIMENTO, Viviane Andrade et al. Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves-Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2011.
- OLIVEIRA, Rosilene Aparecida de et al. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.
- PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. In vitro efficacy of 75 essential oils against Aspergillus niger. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 316-323, 2006.
- PEREIRA, Orlando et al. Estimativa da produção de *Mytella falcata* e de *M. guyanensis* em bancos naturais do estuário de Ilha Comprida—SP—Brasil. Boletim do Instituto de Pesca, v. 29, n. 2, p. 139-149, 2018.
- POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound and free volatiles from clove (Eugenia caryophyllata Thunb.). Journal of Food Biochemistry, v. 34, n. 1, p. 129-141, 2010. POMBO, Joseane Cristina Pinheiro et al. **Efeito antimicrobiano e sinergístico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos**. Segurança Alimentar e Nutricional, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.

- QUEIROZ, Sonia CN; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Química Nova**, v. 24, p. 68-76, 2001.
- RABÊLO, W. F. et al. Caracterização química, toxicidade e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da índia (Syzygium aromaticum). 2010.
- SILVA, A. B., SILVA, T.; FRANCO, E. S.; RABELO, S. A.; LIMA, E. R.; MOTA, R. A.; CAMARA, C. A. G. da; PONTES-FILHO, N. T. Atividade antibacteriana, composição química, e citotoxicidade do *OE*de folhas de árvore de pimenta brasileira (Schinus terebinthifolius Raddi). **Brazilian Journal Microbiologic**, v. 41, p. 158-163. 2010
- SANTOS, Táscya Morganna Morais et al. Avaliação microbiológica e da concentração de vitamina A, ferro e zinco em preparações do molusco sururu (*Mytella falcata*). Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde, v. 9, n. 3, p. 811-822, 2014.
- SANTOS, Thamyres Agostinho Ferreira dos. Extração, caracterização e aplicações do *OE*do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). 2015.
- SHERLEY, Miranda; GORDON, David M.; COLLIGNON, Peter J. Evolution of multi-resistance plasmids in Australian clinical isolates of Escherichia coli. **Microbiology**, v. 150, n. 5, p. 1539-1546, 2004.
- SHIMIZU, Mineo et al. Anti-inflammatory Constituents of Topically Applid Crude Drugs. IV.: Constituents and Anti-inflammatory Effect of Paraguayan Crude Drug" Alhucema" (Lavandula latifolia VILL.). **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 38, n. 8, p. 2283-2284, 1990.
- SILVA, ANGELA APARECIDA et al. Atividade microbiológica de *OE's* obtidos por arraste a vapor. **Uningá Review Journal**, v. 20, n. 3, 2014.
- Simões, C. M.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento 6a. ed.; UFRGS: Porto Alegre, 2007.
- SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM, v. 2016, 2016.
- SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos *OE* 's de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- SIGMA ALDRICH CO. Aldrich handbook of fine chemicals and laboratory equipment. Sigma-Aldrich, 2003.
- SÂTLIN, M. J. et al. Clinical and Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing position statements on polymyxin B and colistin clinical breakpoints. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 9, p. e523-e529, 2020.
- TAHER, Y. A.; SAMUD, A. M.; EL-TAHER, F. E.; BEN-HUSSIN, G.; ELMEZOGI, J. S.; AL-MEHDAWI, B. F. & SALEM, H. A. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. Libyan Journal of Medicine, v. 10, n. 1, p. 28685, 2015.
- TSUCHIYA, H. Anesthetic agents of plant origin: A review of phytochemicals with anesthetic activity. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1369, 2017.

ZHENG, Guo-Qiang; KENNEY, Patrick M.; LAM, Luke KT. Sesquiterpenes from clove (Eugenia caryophyllata) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

ZACTITI, E. M.; KIECKBUSCH, T. G. Processo de produção de filmes plásticos ativos biodegradáveis de alginato de cálcio de baixa solubilidade. **Pedido de Privilégio de Patente. INPI**, p. 01850064015-12, 2005.