



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Atividade Antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos do Óleo Essencial *Lippia gracilis* Schauer frente a Bactérias Contaminantes de Alimentos

PAULA RIBEIRO BUARQUE

SÃO CRISTOVÃO - SE

Fevereiro de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Atividade Antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos do Óleo Essencial *Lippia gracilis* Schauer frente a Bactérias Contaminantes de Alimentos

Paula Ribeiro Buarque

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Orientador: Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino

SÃO CRISTOVÃO - SE

Fevereiro de 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO MESTRADO

Atividade Antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos do Óleo Essencial *Lippia gracilis* Schauer frente a Bactérias Contaminantes de Alimentos

Autor: Paula Ribeiro Buarque

Orientador: Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino
Orientadora/ Universidade Federal de Sergipe – UFS

Prof^o. Dr^o. Álvaro Silva Lima
Examinador Externo/ Instituto de Tecnologia e Pesquisa - Universidade Tiradentes

Prof^a Dr^a Patrícia Beltrão Lessa Constant (Departamento de Tecnologia de Alimentos)
Universidade Federal de Sergipe – UFS

São Cristóvão – SE, 27 de Fevereiro de 2013.

B917a Buarque, Paula Ribeiro
Atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos do óleo essencial *Lippia gracilis* Schauer frente a bactérias contaminantes de alimentos / Paula Ribeiro Buarque ; orientadora Luciana Cristina Lins de Aquino. – São Cristóvão, 2013.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)
– Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Essências e óleos essenciais. 4. *Lippia gracilis*. 5. Microorganismos. I. Aquino, Luciana Cristina Lins de, orient. II. Título.

CDU 664:547.913

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus queridos avós,

Tracema Araújo Campos e Carlo Cono,

Elenza Bello Buarque e Waldir da Cunha Buarque.

VITAE DO CANDIDATO

PAULA RIBEIRO BUAQUE - Nascida aos 30 de abril de 1984, em Aracaju - SE, graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador - BA, em agosto de 2010. Durante a graduação realizou estágios em diversas áreas. Pós-Graduada do Curso de MBA em Negócios de Alimentos da Universidade Cruzeiro do Sul - UNICSUL. Em março de 2011 ingressou no programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju – SE, Campus de São Cristóvão - SE.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus nosso mentor supremo, que em algum momento de sua magnitude desejou, proporcionar estes momentos de felicidade, amor e ciência a minha pequena sabedoria.

Ao meu companheiro de caminhada e esposo e toda minha família, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de alegria e de angústia, pelo incentivo e amor.

A singular amiga e orientadora Prof^a Dr^a Luciana Cristina Lins de Aquino, com quem tive o prazer de conviver com alegria, pelos ensinamentos, companheirismo durante todo processo.

A amiga que sempre me faz acreditar que podemos ser melhores a cada dia, Alana Novais.

Aos colegas do mestrado pela dedicação e cumplicidade: Cláudia, Mateus, Karina, Anne e Fabiana.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFS, pela oportunidade de realizar este mestrado.

Agradeço a todos enfim, que mesmo quando não perceberam, com palavras gestos e atitudes, incentivaram esta pesquisa.

Que a ciência possa gerar cada vez mais dúvidas e incertezas, para que a cada trabalho, tenhamos novas perguntas e que a cada pergunta possamos ter nova resposta.

Atividade Antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos do Óleo Essencial *Lippia gracilis* Schauer frente a Bactérias Contaminantes de Alimentos

RESUMO

Lippia gracilis Schauer, Verbenaceae, é um arbusto com pequenas folhas aromáticas, encontrado em regiões semiáridas do Nordeste do Brasil. É conhecida popularmente como alecrim de tabuleiro e usada no tratamento de infecções da boca, garganta e pele. Algumas espécies do gênero contêm em sua composição química o timol e carvacrol, compostos majoritários de reconhecida atividade antimicrobiana. Esta pesquisa objetivou avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos de óleos essenciais extraídos de plantas *Lippia gracilis* Schauer melhoradas geneticamente e de suas misturas frente a bactérias contaminantes de alimentos. Os principais componentes dos genótipos de *Lippia gracilis* Schauer foram timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpinemo, 1,8- cineole, β - cariofileno, mirceno, α - terpinemo e metil timol, sendo o carvacrol o componente majoritário. Os óleos de *Lippia gracilis* Schauer LGRA 106, LGRA 107 e LGRA 110 na concentração de 50 μ L/mL foram os que apresentaram maior atividade antimicrobiana com halos de inibição entre 9,3 e 10 mm frente às bactérias *Bacillus cereus* (Gram +) e *Serratia marcescens* (Gram-). Os óleos LGRA 106 e LGRA 107 apresentaram os menores valores de CIM de 0,78 μ g/mL para o *Bacillus subtilis* e *Listeria monocytogenes*. A *Pseudomonas aeruginosa* foi o único micro-organismo que não apresentou inibição a nenhum dos genótipos testados. As misturas dos óleos LGRA106, LGRA107 e LGRA 110 aumentaram o potencial antimicrobiano em relação aos óleos isolados, sendo os maiores halos de inibição (de 17 a 27 mm) obtidos para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. A maior inibição ocorreu para *Bacillus cereus* (halo de inibição de 27 mm) quando utilizado a mistura contendo 50 μ L de LGRA106, 100 μ L de LGRA107 e 50 μ L de LGRA110. Os diferentes genótipos de óleos essenciais de *Lippia gracilis*, os quais foram obtidos de plantas melhoradas geneticamente, apresentaram potencial como agente antimicrobiano frente às bactérias testadas e a realização de misturas de óleos pode ser uma alternativa para aumentar o poder antimicrobiano dos óleos do que utilizados isoladamente.

Palavras Chaves: Atividade antimicrobiana, óleos essenciais, *Lippia gracilis*, micro-organismo.

Antimicrobial activity *in vitro* of different chemotypes of *Lippia gracilis* Schauer
essential oil against against foodborne bacterial pathogens

ABSTRACT

Lippia gracilis Schauer, Verbenaceae, is a small shrub with aromatic leaves found in semiarid regions of northeastern Brazil. It is popularly known as rosemary board and used to treat infections of the mouth, throat and skin. Some species contain in their chemical thymol and carvacrol, major compounds of known antimicrobial activity. To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of different chemotypes of essential oils extracted from plants *Lippia gracilis* Schauer genetically improved and their mixtures against bacteria contaminating food. The main components of chemotypes of *Lippia gracilis* Schauer were thymol, carvacrol, p-cymene, γ -terpinemo, 1,8-cineole, β -caryophyllene, myrcene, α -methyl terpinemo and thymol, carvacrol being the major component. The oils of *Lippia gracilis* Schauer LGRA 106, LGRA 107 e LGRA 110 at a concentration of 50 mL/mL presented the highest antimicrobial activity with inhibition zones between 9.3 and 10 mm on the bacteria *Bacillus cereus* (Gram +) and *Serratia marcescens* (Gram -). The oils LGRA 106 and 107 had the lowest MIC values of 0,78 mg/mL for *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *Pseudomonas aeruginosa* is the only microbe that showed no inhibition at any of the tested chemotypes. Mixtures of oils LGRA106, and LGRA107 LGRA 110 increased the antimicrobial potential in relation to oils isolated, being the largest zones of inhibition (between 17 and 27 mm) obtained for the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The greater inhibition observed for *Bacillus cereus* (inhibition of 27 mm) when used with LGRA106 50 μ L, 100 μ L of LGRA107 and 50 μ L of LGRA110. The different chemotypes of *Lippia gracilis* essential oils, which were obtained from plants genetically improved, showed potential as an antimicrobial agent on the bacteria tested and conducting mixtures of oils can be an alternative to increase the power antimicrobial oils than used singly.

Palavras-chave: Antimicrobial Activity, Essential Oil, *Lippia gracilis*, microorganisms.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
SUMÁRIO	iv
LISTA DE TABELA	v
LISTA DE FIGURA	vi
LISTA SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. OBJETIVO GERAL	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. - ÓLEOS ESSENCIAIS	4
3.1.1. – Óleo de <i>Lippia gracilis</i> Schauer	7
3.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	9
4. METODOLOGIA	18
4.1. - MATERIAIS	18
4.2. MICRO-ORGANISMOS	19
4.3. METODOLOGIA	19
4.3.1. Caracterização dos óleos essenciais.....	19
4.3.2. Preparação das Suspensões Microbianas	20
4.3.3. Preparação dos óleos essenciais e dos componentes dos óleos	20
4.3.4. Preparação das Misturas dos Óleos	20
4.3.5. Atividade Antibacteriana	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	24
5.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS GENÓTIPOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS	32
5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA(CBM)	38
5.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS MISTURAS DOS ÓLEOS	40
6. CONCLUSÕES	43
7. PERSPECTIVAS	44

LISTA DE TABELAS

	Pag
Tabela 1 - Principais componentes de alguns óleos essenciais possuidores de propriedades antimicrobianas	15
Tabela 2 - Preparação das misturas de óleos, valores reais e codificados	21
Tabela 3 -Constituintes químicos dos óleos essenciais de <i>Lippia gracilis</i> Schauer	25
Tabela 4 -Média dos Diâmetros dos halos formados dos compostos testados na concentração de 50 µL/mL	32
Tabela 5 -Atividade antimicrobiana dos Óleos Essenciais de <i>Lippia gracilis</i> e dos controles positivos e negativos	34
Tabela 6 - Diâmetro dos halos de inibição em (mm) na concentração de 20, 50, 80 e 100µL/mL dos Óleos Essenciais de <i>Lippia gracilis</i> .	37
Tabela 7 -Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos genótipos LGRA106 e LGRA107 do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i> .	39
Tabela 8 -Diâmetro dos halos de inibição em (mm) das misturas dos Óleos Essenciais de <i>Lippia gracilis</i>	42

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1 - Aparelho de destilação por arraste de vapor tipo Clevenger marca Marconi, modelo MA480	5
Figura 2 - Aparato utilizado para extração de óleos essenciais por hidrodestilação	6
Figura 3 - <i>Lippia gracilis</i> Schauer	8
Figura 4 - Estrutura química do timol (a) e do carvacrol (b)	10
Figura 5 - Estrutura química do eugenol	11
Figura 6 - Estrutura química do p-cimeno	11
Figura 7- Estrutura química do carvona	12
Figura 8- Estrutura química do cinalmodeido	12
Figura 9- Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana	14
Figura 10 - <i>Lippia gracilis</i> Schauer	18
Figura 11 - Discos de papel “mata borrão” pressionados em superfície de ágar semeado	22
Figura 12 - Discos dos controles positivos e negativos pressionados em superfície de ágar semeado	22
Figura 13 – Constituintes químicos principais dos genótipos de óleos essenciais de <i>Lippia gracilis</i> Schauer	28

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ATCC - *American Type Culture Collection*

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DMSO - Dimetilsulfoxido

CG- EM - Cromatografia gasosa-espectrometria de massa

IR - Índice de retenção

LGRA - *Lippia gracilis*

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm - Milímetro

NCCLS - *National committee for Clinical Laboratory Standards*

pH - Potencial hidrogeniônico.

UFC - Unidade Formadora de Colônia

v/v - Volume/Volume

µg - Micrograma

µL - Microlitro

°C - Graus Celsius

% - Porcentagem

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem começou a elaborar seu próprio alimento, além do interesse pelas características sensoriais, também ganharam destaque as preocupações com as doenças veiculadas por alimentos (DVA's). As quais podem ser causadas pela ingestão de micro-organismos viáveis (infecção) ou de toxinas, por eles, produzidas (intoxicação) em quantidades suficientes para o desenvolvimento de quadro patológico (BRASIL, 2001). As toxinfecções alimentares estão relacionadas ao consumo de alimentos que sofreram manipulação associada às más condições de manipulação de armazenamento e acondicionamento, permitindo a exposição direta ao ambiente. Fatores como a qualidade da matéria-prima, condições ambientais, características dos equipamentos usados na preparação e condições técnicas de higienização são pontos importantes na epidemiologia das DVA's (VAN AMSON *et al.*, 2006).

Aliado a preocupação com as DVA's, um dos grandes problemas da indústria de alimentos, além de garantir a qualidade microbiológica dos alimentos, é aumentar a vida de prateleira dos mesmos, já que a maior parte dos alimentos de origem vegetal ou animal se deterioram com facilidade. Essa perda é dependente de vários fatores, como a composição do alimento, embalagem, condições de armazenamento, presença de micro-organismos contaminantes, entre outros (JAY, 2005).

Logo, a crescente preocupação com o tema qualidade de alimentos tem despertado o interesse para o uso de várias ferramentas biotecnológicas na expectativa de atender a oferta de um produto seguro e, ao mesmo tempo, contemplar as exigências de comercialização. Entre essas ferramentas, podemos destacar o uso dos óleos essenciais que tem ganhado importância por apresentar atividade antimicrobiana frente a uma grande variedade de micro-organismos. Devido a isto, os óleos essenciais, como *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) (MENDONÇA, 2004), *Origanum vulgare* (orégano) (BUSATTA *et al.* 2007), *Origanum majorana* L (manjerona) (BUSATTA *et al.* 2008), tem tido muitas aplicações na conservação de alimentos crus e processados.

Vários pesquisadores tem demonstrado o potencial de óleos essenciais como conservantes naturais, os óleos de *Rosmarinus officinalis* L.(alecrim), *Cinnamomum zeylanicum* L. (canela), *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Origanum majorana*, tem apresentado atividade antimicrobiana frente às bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli*, e *Salmonella* Enteritidis. (BARBOSA *et al.*, 2009, CARSON *et al.*, 1996, NENOFF *et al.*, 1996).

O óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer tem demonstrado atividade antimicrobiana frente a micro-organismos como os fungos *Geotrichum candidum*, *Trichoderma viride*, *Fusicoccum* sp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp e espécies de bactérias tais como *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterobacter hormaechei* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; DANTAS *et al.*, 2010). A bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, conhecida por causar a tuberculose, também se mostrou sensível à ação do óleo de *Lippia gracilis* comparado ao uso de drogas sintéticas (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Misturas entre óleos essenciais e/ou compostos podem aumentar a atividade antimicrobiana em relação aos óleos isolados devido ao efeito sinérgico entre os componentes, além disto a utilização de misturas em alimentos reduziria o sabor residual dos óleos, minimizando possíveis efeitos de rejeição sensorial. (HAMMER *et al.*, 1999; HOLLEY; PATEL, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes genótipos de óleos essenciais extraídos de *Lippia gracilis* Schauer e de suas misturas frente a bactérias contaminantes de alimentos.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a atividade antimicrobiana de 7 genótipos de óleo essencial por meio da técnica de difusão em discos frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*;
- Selecionar 2 genótipos de óleos essenciais com maior atividade antimicrobiana e determinar as concentrações inibitória mínima e bactericida mínima destes óleos frente às bactérias listadas;
- A partir dos genótipos selecionados, realizar misturas e avaliar o potencial antimicrobiano das mesmas frente às bactérias listadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. - Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor e constituído por metabólitos secundários de plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado a quente como o Mediterrâneo e países tropicais (MARINHO *et al.*, 2011). Estes óleos constituem-se em complexas misturas de substâncias voláteis, geralmente lipofílicas cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, entre outros, em diferentes concentrações, sendo um composto ativo majoritário. Podem apresentar estruturas de maior massa molecular como cumarinas, homólogos superiores de terpenos e fenilpropanos (SILVA, 2010; SIMÕES; SPITZER, 2000). Eles podem ser sintetizados por todas as partes da planta, como por exemplo, em brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, madeira ou cascas, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, as células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI *et al.*, 2008; BURT, 2004).

Conhecido pela sua atividade bactericida, fungicida e virucida e propriedades medicamentosas e flavorizantes, os óleos essenciais são usados em embalsamentos, conservação dos alimentos, como antibióticos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatório, antiespasmódico e anestésico local (BAKKALI *et al.*, 2008; BUSATTA, 2006). Na natureza desempenham um papel importante na proteção das plantas e também servem para atrair alguns insetos que favorecem a dispersão de pólen e sementes, ou mesmo para repelir outros insetos indesejáveis (BAKKALI *et al.*, 2008).

Embora os óleos essenciais sejam bastante estudados, o seu uso em alimentos como substâncias antimicrobianas é bastante limitado devido à possibilidade de alteração do sabor, pois doses eficazes contra micro-organismos podem mudar a aceitabilidade do produto. Como consequência, há uma demanda crescente para conhecer as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais, para que se possa atingir um balanço entre a eficácia como agente antimicrobiano e a aceitabilidade sensorial (KOUTSOUMANIS *et al.*, 1998).

Normalmente os óleos essenciais são obtidos por meio de vapor ou hidrodestilação, sendo o primeiro desenvolvido na Idade Média pelos árabes. O processo de extração requer grandes quantidades de massa verde, tendo em vista que o óleo representa cerca

de 0,05 até 10% da planta, quer seja da folha, caule, casca, raiz ou fruto (SANTOS *et al.*, 2000 *apud* BUSATTA, 2006).

A destilação a vapor (Figura 1) consiste em passar vapor à temperatura de aproximadamente 100°C por um leito fixo de massa verde da planta aromática. Pelo efeito da temperatura do vapor em fluxo ascendente, ocorre o rompimento das células odoríferas da planta aromática, em decorrência do aumento da pressão interna das células devido à vaporização parcial do óleo em seu interior. O óleo, em contato com o vapor, é arrastado para a parte superior do vaso extrator até o condensador. Isto ocorre devido à diferença de pressão entre a entrada de vapor no vaso extrator e o bocal de saída do condensador. Do bocal de saída do condensador, água e óleo essencial em emulsão (o condensado) são conduzidos por gravidade ao vaso de decantação/separação, chamado de vaso Florentino, onde ocorre a separação das fases. Parte do óleo essencial que se mantém emulsionado na água forma de hidrolato (CASSEL; VARGAS, 2008).



Figura 1 - Aparelho de destilação por arraste de vapor tipo Clevenger marca Marconi, modelo MA480 (Adaptado SILVA *et al.*, 2010).

A hidrodestilação é o método de extração mais simples e consiste em um sistema no qual a matéria prima é colocada juntamente com água em um balão, acoplado a um condensador por onde há fluxo de água para refrigeração (Figura 2). A mistura água e matéria prima são aquecidas diretamente. O vapor produzido na destilação condensa-se no condensador e é recolhido. (JAKIEMIU, 2008).

Alguns pesquisadores têm extraído óleos essenciais de várias plantas tais como: *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cinnamomum zeylanicum* (caneleira), *Lippia alba*, *Lippia alba* f. intermédia (erva cidreira), *Ocimum basilicum* (manjeriçao) e *Salvia officinalis* (sálvia), e outros. Esses óleos extraídos têm demonstrado ação antimicrobiana contra diversos micro-organismos, principalmente os deteriorantes de alimentos (BUSATTA *et al.*, 2007, DAMBOLENA *et al.*, 2010, HUSSAIN *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2006, PASCUAL *et al.*, 2001, SANTURIO, 2007).



Figura 2 –Aparato utilizado para extração de óleos essenciais por hidrodestilação (BUSATTA, 2006).

Os produtos naturais estão sujeitos à variação do clima, altitude, solo, luminosidade e essas variações influenciam diretamente nos produtos do seu metabolismo secundário e, portanto no óleo essencial. A relação entre os diversos compostos químicos que formam o óleo essencial se modifica e, como consequência, a sua atividade antimicrobiana pode ser anulada, aumentada ou ainda modificada (PEREIRA, 2010). Em geral, na separação e isolamento dos componentes de um extrato ou óleo essencial, utilizam-se métodos cromatográficos, tais como a cromatografia em coluna(CC),

cromatografia líquida sob vácuo, cromatografia sob pressão, cromatografia flash, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em papel, cromatografia-contracorrente-gota-a-gota (“dropletcountercurrent chromatography”; DCCC ou “micro droplet counter-current chromatography”; MDCCC) (ANGIONI *et al.*, 2006).

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma das técnicas mais eficientes na elucidação de um determinado composto, quer seja na indústria ou nos laboratórios de pesquisa científica. Vários autores destacam a CG entre as melhores ferramentas analíticas e de extrema utilidade na análise de misturas complexa (AVATO *et al.*, 2005; BAGAMBOULA *et al.*, 2004). Essa metodologia tem sido aplicada na determinação de teor de gases, moléculas orgânicas complexas, pesticidas, alguns metais, presença de impureza em uma substância e, muitas vezes, numa primeira aproximação, informa sobre a identidade de um composto, sendo a técnica preferida para o estudo das composições dos óleos essenciais (MOYNA *et al.*, 2002).

3.1.1. – Óleo de *Lippia gracilis* Schauer

A família Verbenaceae Juss abrange cem gêneros distribuídos em regiões tropical e subtropical de todo o mundo. O gênero *Lippia* Houtt, cujo nome deriva de August Lippi, um botânico italiano, é composto de cerca de duzentas espécies representadas por ervas, arbustos e pequenas árvores que são frequentemente aromáticas e distribuídas nas Américas Central e do Sul e territórios da África Tropical (TERBLANCHÉ, KORNELIUS, 1996; PASCUAL *et al.*, 2001).

O Brasil é um dos maiores centros de diversidade, do referido táxon, possuindo aproximadamente de 70-75% de todas as espécies conhecidas (VICCINI *et al.*, 2006), principalmente na área abrangida pelos municípios de Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE (LEAL *et al.*, 2003). Na Guatemala e no Brasil, espécies de *Lippia sp.*, *Lippia alba* N.E. Brown e *Lippia gracilis* H.B.K. são aplicadas externamente para tratar doenças cutâneas, queimaduras, feridas, úlceras: (LEMOES *et al.*, 1992).

O gênero *Lippia* é tradicionalmente utilizado no tratamento de distúrbios gastrintestinal, respiratória e cutânea. Algumas espécies como *Lippia oreogonoides*, e *Lippia sidoides* têm mostrado atividade frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Enteritidis*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans* (PESSOA *et al.*, 2005; SANTOS, 2004).

A espécie *Lippia gracilis* Schauer (Figura 3), a qual na medicina tradicional nordestina é popularmente conhecida como alecrim da chapada, alecrim de serrote, alecrim pimenta, cidreira da serra ou alecrim de tabuleiro, é utilizada no tratamento de infecções da boca, garganta e pele. A espécie é um arbusto ramificado de até 2 m de altura, com caule quebradiço, folhas simples, pequenas, com pouco mais de 1 cm de comprimento, aromáticas e picantes, dotadas de nervação impressa claramente visível. Seu fruto é do tipo aquênio, muito pequeno, com sementes de germinação rara (PASCUAL *et al.*, 2001). É uma planta, que se caracteriza pelo acúmulo em abundância de óleos essenciais em tricomas glandulares, cuja composição é compreendida principalmente por timol e carvacrol como metabólitos secundários, os quais exibem forte atividade antimicrobiana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006). A produção desses metabólitos secundários está intimamente relacionada a um conjunto de variações morfológicas, anatômicas e fitoquímicas resultantes de adaptações a condições ambientais (SANTOS *et al.*, 2004).



Figura 3- *Lippia gracilis* Schauer (Adaptado de MARCELINO *et al.*, 2005)

Existem poucos estudos sobre as propriedades farmacológicas dessas espécies e a maioria destes estudos concentrou sua atenção na atividade antimicrobiana (OLIVEIRA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2011; DANTAS *et al.*, 2010; NETO *et al.*, 2010), efeitos repelente, antifúngicos ou larvicida de óleos essenciais ou diferentes extratos. Os óleos

essenciais desta espécie contêm proporções variáveis de fitoquímicos antimicrobianos de ação comprovada, o que potencialmente lhe confere atividade antibacteriana eficaz. Embora sua composição e atividades biológicas indicarem diversas aplicações práticas no controle de patógenos humanos na indústria de alimentos e hospitais, a ação do óleo essencial de *Lippia gracilis* sobre bactérias clinicamente importantes ainda não foi completamente avaliada (MELO *et al.*, 2010).

3.2. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais

Estudos demonstram que compostos fenólicos e terpenóides inibem o crescimento de uma grande variedade de micro-organismos. Este mesmo potencial foi detectado de forma natural em algumas plantas medicinais, ervas e temperos, quando avaliados seus óleos essenciais, apresentando entre outras funções biológicas a atividade antimicrobiana (BAGAMBOULA *et al.*, 2004). A atividade antibacteriana de óleos essenciais pode ser influenciada por vários parâmetros, com destaque para o tipo, composição, concentração, processamento e estocagem do óleo essencial. Por outro lado, o tipo de micro-organismo e composição do substrato utilizado para crescimento do micro-organismo também podem fornecer resultados distintos para esta propriedade dos óleos essenciais (BERTINI *et al.*, 2005).

Segundo Lambert *et al.* (2001) na composição dos óleos essenciais há compostos que apresentam maior atividade antimicrobiana, sendo que a mistura de dois ou mais compostos em quantidades adequadas, podem apresentar atividade antimicrobiana sobre as bactérias mais resistentes. Além disso, o sinergismo entre compostos do óleo deve ser levado em conta (DELAMARE *et al.*, 2007).

A química dos óleos essenciais é complexa, mas geralmente os óleos mais ativos apresentam as principais moléculas que possuem atividade antibacteriana o carvacrol, o timol e o eugenol (fenóis). Logo após os fenóis, em ordem decrescente de funcionalidade, situam-se os álcoois monoterpênicos, tais como linalol, geraniol, terpineol, mentol e outros, seguido pelo grupo dos aldeídos, tais como o citral, geranial, citronelal, cuminal e outros. Finaliza-se esta lista com o grupo das cetonas tais como verbenona, tujona, mentona e carvona, e o grupo dos ésteres, tais como estragol e anetol (NOVACOSK; TORRES, 2006).

Na sequência estão apresentados alguns compostos de óleos essenciais e seu mecanismo de ação sobre micro-organismos:

1. **Carvacrol e timol:** Timol possui estrutura similar ao carvacrol, diferem pela localidade do grupo hidroxila sobre o anel fenólico. As duas substâncias parecem tornar a membrana permeável (LAMBERT *et al.*, 2001). Ambas as estruturas desintegram a membrana externa de bactérias negativas liberando os lipopolissacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. A presença de cloreto de magnésio não influencia nesta ação sugerindo um mecanismo de quelação de cátions diferente na membrana externa (HELANDER *et al.*, 1998).

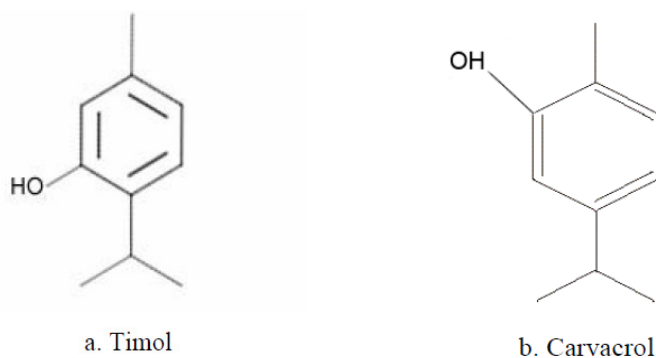


Figura 4: Estrutura química do timol (a) e do carvacrol (b) (CAVALCANTI, 2006).

2. **Eugenol:** Possui a capacidade de inibir a produção de amilase e protease por *Bacillus cereus*, degradando a parede celular e provocando a lise celular (THOROSKI *et al.*, 1989).

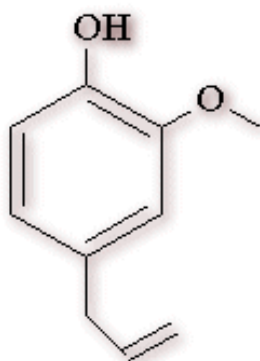


Figura 5: Estrutura química eugenol(PINTO, 2012).

3. **p-Cimeno:** Precursor do carvacrol, é hidrofóbico e provoca maior dano na membrana citoplasmática da bactéria do que o carvacrol (ULTEE *et al.*,2002).

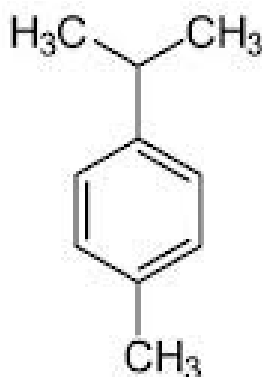


Figura 6: Estrutura química p-cimeno(PINTO, 2012).

4. **Carvona:** Quando testado em concentrações maiores do que a sua concentração inibitória mínima (CIM) (1mM), o carvone dissipa o pH gradiente e o potencial da membrana celular. O crescimento de *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus lactis* diminuiu de acordo com as concentrações de

carvone, sugerindo que ele atue perturbando o estado metabólico geral da célula (OOSTERHAVEN *et al.*, 1995).

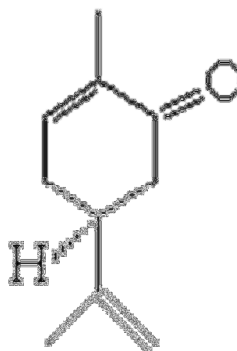


Figura 7: Estrutura química carvona (PINTO, 2012).

5. **Cinamaldeído:** É conhecido por ter ação inibitória sobre *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* em concentrações de aproximadamente 0,1%, com as do carvacrol e timol, mas não desintegra a membrana externa e nem provoca a perda de ATP intracelular (HELANDER *et al.*, 1998). O grupo carbonila tem afinidade com proteínas prevenindo a ação de aminoácidos descarboxilases em *Enterobacter aerogenes* (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995).

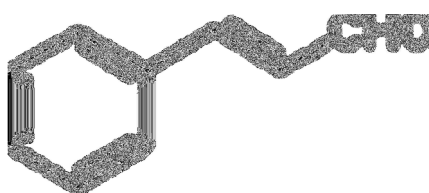


Figura 8: Estrutura química cinamaldeído (PINTO, 2012).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais *in vitro* tem sido amplamente estudada sobre uma série de micro-organismos. O surgimento de bactérias multirresistentes representa um desafio no tratamento de infecções, sendo assim notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para uso no combate a esses micro-organismos (PEREIRA, 2010). Além disto, a propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais é considerada de grande interesse para as indústrias

alimentícias, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição dos conservantes sintéticos artificiais (OKOH *et al.*, 2010).

A susceptibilidade dos micro-organismos a determinado óleo essencial depende das propriedades deste óleo, como sua composição química e suas concentrações, bem como dos micro-organismos utilizados (SANTURIO, 2007). Embora haja exceções na literatura, em geral as bactérias gram-positivas são mais sensíveis do que as bactérias gram-negativas aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais. Uma possível explicação para esta atividade pode estar relacionada à dificuldade dos óleos essenciais em difundir a membrana externa, pois existe uma barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas e combinações hidrofóbicas, embora não seja totalmente impermeável. Da mesma forma, observa-se que os fungos são mais sensíveis aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais do que as bactérias (HELANDER *et al.*, 1998; BAGAMBOULA *et al.*, 2004).

Uma característica importante, responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam, são os componentes hidrofóbicos que permitem a divisão de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-a mais permeável. Os locais, ou estruturas, da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes de produtos naturais são ilustrados na Figura 9. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

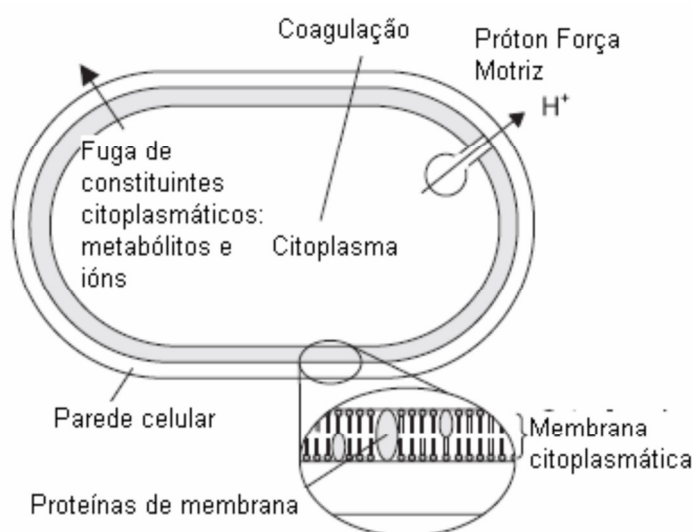


Figura 9 -Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana (Adaptado de BURT, 2004)

Componentes de óleos essenciais agem também em proteínas da membrana citoplasmática (PINTO, 2010). Hidrocarbonetos cíclicos poderiam agir sobre enzimas ATPases que são conhecidas por estarem localizados na membrana citoplasmática e rodeadas por moléculas lipídicas e hidrocarbonetos lipídicos, os quais poderiam distorcer a interação lipídioproteína, interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína. Alguns óleos essenciais estimularam o crescimento de pseudomicélios, uma indicação de que pode atuar sobre enzimas envolvidas na síntese de componentes estruturais das bactérias (SILVA *et al.*, 2010).

Na Tabela 1 estão apresentados alguns óleos essenciais, seus componentes principais e os micro-organismos para os quais foi demonstrada a atividade antimicrobiana.

Tabela 1: Principais componentes de alguns óleos essenciais possuidores de propriedades antimicrobianas

Óleo essencial	Componentes principais	Atividade antimicrobiana	Referência
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	cinamaldeído, ácido cinâmico, eugenol e linalol	<i>L. monocytogenes</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. enterica</i> <i>S. marcescens</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>E. coli</i>	Lorenzi; Matos, 2002 Trajano <i>et al.</i> , 2009
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	p-cimeno e γ -terpineno e carvacrol	<i>E. coli</i> <i>S. subtilis</i>	Höferl <i>et al.</i> , 2009 Silva <i>et al.</i> , 2010
<i>Ocimum basilicum</i> (manjeriço)	linalol e 1,8-cineol	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Hussain <i>et al.</i> , 2008
<i>Salvia officinalis</i> (sálvia)	terpenóides como tujona, cineol, cânfora, borneol,	<i>B. cereus</i> , <i>B. megatheriu</i> <i>B. subtilis</i> <i>A. hydrophila</i> <i>A. sobria</i> <i>K. oxytoca</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Lorenzi; Matos, 2002 Delamare <i>et al.</i> , 2007
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	1,8 cineol, cânfora e borneol	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	Romeo <i>et al.</i> , 2008 Trajano <i>et al.</i> , 2009 Dal Pozzo <i>et al.</i> , 2011
<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	timol e carvacrol	<i>Listeria spp.</i>	Gutierrez <i>et al.</i> , 2009 Pozzatti <i>et al.</i> , 2010
<i>Lippia graveolens</i> (lípia)	carvacrol e o-cimeno	<i>Staphylococcus spp.</i>	Dal Pozzo <i>et al.</i> , 2011
<i>Coriandrum sativum</i> (coentro)	linaloole E-2-decanal	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>L. monocytogenes</i>	Delaquis <i>et al.</i> , 2002

Os óleos essenciais apresentam duas principais características como agentes antimicrobianos: i) sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e ii) são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos micro-organismos frente a sua ação (DAFERERA *et al.*, 2003).

Em relação aos óleos essenciais de *Lippia*, os componentes encontrados em maior frequência são: limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno e timol. Já o óleo essencial de *Lippia gracilis* possui timol, carvacrol (monoterpenos) e α -copaene, β -cubebene (sesquiterpenos) como componentes majoritários (LEMOS *et al.*, 1992).

A composição química do óleo essencial da *Lippia gracilis* reportada na literatura, mostra flutuações quantitativas dos componentes majoritários, provavelmente devido às condições genéticas, não padronização de cultivo e clima. Em três estudos realizados demonstraram as seguintes variações na composição dos componentes majoritários do óleo: carvacrol 47,8%, 11,8%, 54,4%; o timol 4,8%; 30,6%, 1,9% e o p-cimeno 19,2%, 10,7% e 10,7% (LEMOS *et al.*, 1992; MATOS, 1999; PESSOA *et al.*, 2005). As propriedades farmacológicas antimicrobianas, provavelmente devem-se ao fato de possuir dentre outros compostos, os terpenos timol e o carvacrol.

Segundo Oliveira *et al.* (2008), os óleos essenciais das plantas do gênero *Lippia* podem ser uma alternativa para o controle de fungos contaminantes encontrados em plantas. Em especial à espécie *Lippia gracilis*, diversos estudos tem demonstrado a capacidade inibitória dos seus óleos essenciais sob contaminantes microbianos (OLIVEIRA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2011; DANTAS *et al.*, 2010; NETO *et al.*, 2010). Ensaio antimicrobianos com este óleo mostraram forte atividade frente a bactérias Gram negativas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella spp.* *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e Gram positivas *Staphylococcus*, *Streptococcus*, fungos *Saccharomyces* e *Trichophyton* (MATOS, 1999; PESSOA *et al.* 2005). Dantas *et al.* (2010), verificaram que o óleo essencial de *Lippia gracilis* apresentou atividade inibitória satisfatória, demonstrando um amplo espectro de ação frente à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermides e *Listeria monocytogenes* em concentrações inibitórias mínimas de 9, 14 e 20 µL/mL do óleo essencial.

Em relação às misturas de óleos alguns pesquisadores têm demonstrado a maior eficiência destas como agentes antimicrobianos quando comparado aos óleos isolados. Djenane *et al.*, 2011 têm demonstrado que os óleos de *Pistacia lentiscus* e *Satureja montana* foram mais eficazes frente a *L. monocytogenes* quando aplicados à carne bovina moída. Gutierrez *et al.* (2008) constatou que o óleo de orégano combinado com tomilho em doses baixas pode ser considerada como um alternativa em potencial para o controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, e as combinações de óleo de orégano e manjerona ou óleo de tomilho e sálvia podem ser úteis para o controle de bactérias gram (-) e bactérias gram (+), respectivamente. LU Fei *et al.* (2011) verificaram que combinações de óleo de canela apresentaram um efeito aditivo ou indiferente contra bactérias alimentares, indicando que este pode aumentar o efeito antibacteriano em combinação com outros óleos essenciais. Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *R. officinalis* combinados em concentrações sub-inibitórias foram eficazes na inibição do crescimento e sobrevivência de organismos patogênicos e micro-organismos deteriorantes associados a vegetais minimamente processados (AZEREDO *et al.*, 2011).

4. METODOLOGIA

4.1. - Materiais

Sete genótipos de óleos essenciais de planta *Lippia gracilis* Schauer (Figura 10), denominados LGRA 106, LGRA 107, LGRA 108, LGRA 109, LGRA 110, LGRA 201 e LGRA 202, foram cedidos do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal de Sergipe (UFS), localizado na Fazenda Experimental “Campus Rural da UFS” município de São Cristóvão – SE. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas por hidrodestilação através de aparelho do tipo Clevenger no Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Sergipe (UFS). A identificação e quantificação dos compostos dos óleos essenciais foram realizadas e gentilmente cedidas pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe.

Os componentes Carvacrol, α -Terpineno, β -Cariofileno e p-Cimeno foram adquiridos no Laboratório de Química de Produtos Naturais no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, o Timol foi adquirido no laboratório de Agronomia no Departamento de Agronomia.

Os meios de cultura, o caldo e ágar Muller-Hinton foram adquiridos da HIMEDIA, o emulsionante Tween 80 adquirido da VETEC, o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) adquirido da SYNTH e o composto Cloreto de Sódio também da SYNTH.



Figura 10- *Lippia gracilis* Schauer

4.2. Micro-organismos

As cepas dos micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Serratia marcescens* (ATCC 14756), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) foram adquiridos da coleção de micro-organismos de referência em vigilância sanitária da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, conservadas em caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e solução de glicerol a 20%, na proporção de 1:1 e armazenadas em ultrafreezer à -80°C no laboratório de microbiologia de alimentos da Universidade Federal de Sergipe.

4.3. Metodologia

4.3.1. Caracterização dos óleos essenciais

Todos os óleos foram analisados no laboratório de cromatografia do departamento de química da Universidade Federal de Sergipe. A análise da composição química foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM; Shimadzu, modelo QP 5050^a, Kyoto, Japão), equipado com autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-fenil-95%dimetilpoliloxano) de 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm de espessura de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL.min⁻¹, temperatura de forno foi programada mantendo-se constante a 50°C durante 1,5 min, seguido de um aumento de 4°C min⁻¹ até atingir 250°C mantendo constante esta temperatura por 5 min; temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector de 280°C; volume de injeção foi de 0,5 µL de óleo diluído em acetato de etila (25 mg.mL⁻¹); taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 64,20KPa. As condições do EM foram: detector de captura iônica operando com ionização por impacto de elétrons a 70 eV; velocidade de varredura de 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Os componentes do óleo essencial foram identificados através da comparação de seu espectro de massas com os espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007) e com espectros do banco de dados do equipamento (WILEY8 e NIST05), bem como pela comparação do índices de retenção (IR), que foram determinados utilizando uma série homologa de *n*-alcanos (C₈-C₁₈)

injetada nas mesmas condições cromatográficas das amostras e calculados de acordo com a equação de Van den Dool & Kratz (1963).

4.3.2. Preparação das Suspensões Microbianas

Uma alçada de cada massa celular microbiana (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*) foi transferida para tubos de ensaio contendo 4 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%). Em seguida, tais suspensões foram agitadas durante 2 min com auxílio de aparelho Vortex. Após agitação, cada suspensão teve sua turbidez comparada ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland, o qual corresponde a um inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias UFC/mL.

4.3.3. Preparação dos óleos essenciais e dos componentes dos óleos

Os sete genótipos de óleos essenciais foram preparados em Tween 80 a 1% nas concentrações de 20 µL/mL, 50 µL/mL, 80 µL/mL e 100 µL/mL. Os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância com teste de diferença das médias quando significativo (Teste de Tukey), empregando o programa SAS.

Os componentes, Carvacrol, α -Terpineno, β -Cariofileno e p-Cimeno foram preparados na concentração de 50 µL/mL em Tween 80 a 1%. Já o componente Timol foi preparado na concentração de 50 µL/mL em Tween 80 a 100%.

A atividade antimicrobiana dos óleos e dos componentes foi avaliada através da técnica de difusão em discos conforme descrito no item 4.3.5.1.

Para os dois genótipos de óleo essencial que apresentaram maior halo de inibição foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

4.3.4. Preparação das Misturas dos Óleos

Os três genótipos que apresentaram maiores halos de inibição frente às bactérias citadas, foram utilizados para preparar as misturas dos óleos. As misturas foram preparadas utilizando-se combinações dos 3 óleos nos volumes de 20 µL, 50 µL, 80 µL e 100 µL, distribuídos em grupos 1, 2 e 3 conforme descrito na Tabela 2. Em cada um

dos 13 volumes de óleo foi adicionado 1 mL de solução de tween 80 a 1%. Após a preparação das misturas, estas foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em discos, sendo, portanto avaliado o tamanho dos halos de inibição.

Tabela 2- Preparação das misturas de óleos, valores reais e codificados.

Grupo	Misturas	LGRA	LGRA	LGRA
		106 (µL)	107 (µL)	110 (µL)
1	1	80	20	20
	2	20	80	20
	3	20	20	80
	4	80	20	80
	5	20	80	80
	6	80	80	20
2	7	0	50	50
	8	50	0	50
	9	50	50	0
3	10	100	50	50
	11	50	100	50
	12	50	50	100
	13	50	50	50

LGRA: *Lippia gracilis* Schauer.

4.3.5. Atividade Antibacteriana

A atividade antimicrobiana dos sete genótipos de óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer, dos componentes dos óleos e das misturas de óleos foi determinada pela técnica de difusão em discos frente aos micro-organismos: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Serratia marcescens* (ATCC 14756), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076).

4.3.5.1. Método de Difusão em Discos

O método de difusão em discos foi realizado segundo protocolo descrito pela NCCLS, 2008. Em placas de Petri 90 x 15 mm, de vidro, esterilizadas foi colocado aproximadamente 20 mL de Agar Muller-Hinton e em seguida foi semeada uma alçada do inóculo do micro-organismo teste, com *swab* descartável esterilizado. A seguir,

discos de papel mata-borrão de 6 mm de diâmetro esterilizados foram embebidos com 10 µL de solução (óleo essencial, componente ou mistura de óleo), em seguida no máximo 4 discos foram colocados sobre o meio de cultura Agar Muller-Hinton em cada placa contendo o micro-organismo (Figura 11). Os testes foram realizados em quadruplicada e as placas foram incubadas a 35 °C ± 2/24 h. Em uma placa também semeada (Figura 12) com o inóculo foram testados como padrões positivos discos dos antibióticos: Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg) e Cloranfenicol (30 µg) e como controle negativo utilizou-se um disco com solução de tween 80 a 1%. O critério de seleção foram diâmetros de halos de inibição de crescimento maiores que 6,9mm.

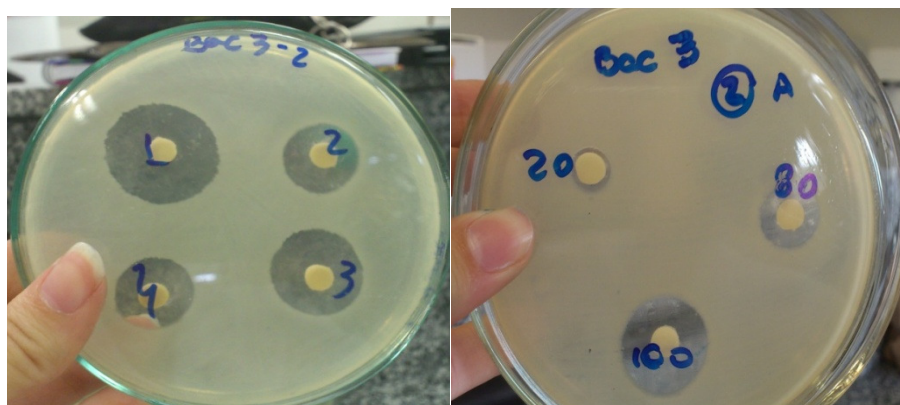


Figura 11. Discos de papel “mata borrão” pressionados em superfície de ágar semeado.

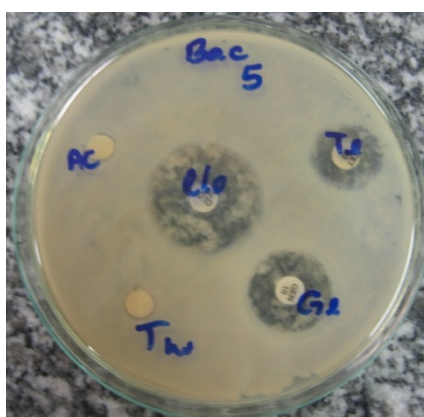


Figura 12. Discos dos controles positivos e negativos pressionados em superfície de ágar semeado (Clo = cloranfenicol; Te= tetraciclina; Ge= gentamicina; Tw= Tween 80 a 1%).

4.3.5.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para os 2 genótipos de óleo essencial que apresentaram maiores halos de inibição frente às bactérias testadas. Para os experimentos utilizaram-se placas de microtitulação, estéreis contendo 96 poços com fundo em formato U. O meio de cultura utilizado foi o caldo Muller-Hinton e agente emulsificante, dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%. Foram realizadas diluições (400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 e 0,78 $\mu\text{L/mL}$) dos genótipos dos óleos acrescido ao meio. Foram adicionados 100 μL de caldo Muller-Hinton, em todas as cavidades das colunas 2 a 12. Em seguida foram adicionados nos poços da microplaca da primeira coluna 200 μL da diluição de óleo a 400 $\mu\text{L/mL}$ (meio+T80+óleo) de modo que a primeira sequência de poços apresentasse a maior concentração do óleo essencial, e a décima primeira fila apresenta-se a menor concentração. Em seguida, adicionou-se 100 μL do inóculo, ajustado à escala 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) nas colunas de 1 a 11. Controles positivos e negativos foram feitos para determinar a viabilidade celular e a ausência de contaminação, sendo na coluna 11 o controle positivo, poços contendo o caldo Muller-Hinton e o inóculo, e na coluna 12 o controle negativo, poços contendo o caldo Muller-Hinton e óleo na concentração de 0,78 $\mu\text{L/mL}$. As microplacas foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2/24$ h. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

A CIM do óleo essencial foi determinada para cada cepa de bactéria por meio de observação visual, tomando como base o fato de que o crescimento destes microorganismos nos poços da placa de microdiluição ocorre por meio da formação dos chamados botões de crescimento (aglomerado de células). Desta forma, considerou-se como CIM a menor concentração do óleo essencial capaz de provocar uma inibição visual total do crescimento da cepa obtida no final do período de incubação.

4.3.5.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram retirados 100 μL de amostras e semeados em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton espalhadas com alças de Drigalsky. As placas foram incubadas a temperatura de $35^\circ\text{C} \pm 2/24$ h. A CBM foi aquela onde se observou ausência de crescimento de colônias bacterianas nas placas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição dos óleos essenciais

A composição dos óleos analisados de *Lippia gracilis* Schauer foi semelhante ao relatado na literatura (ALBUQUERQUE, 2005; LEMOS *et al.*, 1992). A análise cromatográfica permitiu identificar, em média, cerca de 40 compostos representando 99% dos óleos essenciais identificados, os índices de retenção e as quantidades obtidas estão demonstradas na Tabela 3. Os principais componentes dos genótipos de *Lippia gracilis* Schauer foram: o timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpinemo, 1,8- cineole, β -cariofileno, mirceno, α - terpinemo e metil timol (Figura13).

Tabela 3 - Constituintes químicos dos óleos essenciais das de *Lippia gracilis* Schauer.

Composto	LGRA 106		LGRA 107		LGRA 108		LGRA 109		LGRA 110		LGRA 201		LGRA 202	
	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)
a-Thujeno	0,45	6567	0,98	6558	0,99	6564	0,85	6575	0,95	6575	1,28	6575	1	6575
a-Pineno	0,28	6789	0,24	6783	0,36	6789	0,26	6800	0,33	6800	0,36	6800	0,28	6800
Canfeno	NE	NE	NE	NE	0,25	7306	NE	NE	NE	NE	0,26	7308	0,43	7300
b-Pineno	0,16	8200	NE	NE	0,15	8204	NE	NE	NE	NE	0,12	8208	NE	NE
Mirceno	4,12	8592	2,65	8592	2,05	8597	2,06	8608	3,1	8608	3,2	8608	3,02	8608
Sabineno	0,15	4021	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,14	8050	NE	NE
a-Felandreno	NE	NE	0,16	0,16	NE	NE	NE	NE	12,82	2,28	0,23	9175	0,14	9175
a-Terpineno	1	9542	2,28	9533	1,8	9539	1,82	9550	2,28	9550	3,01	9550	2,24	9550
p-Cimeno	6,7	9817	11,46	9817	11,75	9820	12,69	9825	12,87	9825	13,74	9825	12,97	9825
Limoneno	0,36	9975	0,39	9967	0,38	9975	0,21	9992	0,37	9992	0,44	9992	0,42	9992
1,8 Cineole	3,93	10083	0,62	10075	2,11	10083	NE	NE	2,5	10100	1,5	10100	0,73	10100
g-Terpineno	NE	NE	13,52	11025	8,82	11028	8,56	11033	11,81	11033	21,11	11033	11,99	11033
d-3-Careno	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,12	9258	NE	NE
γ-Terpineno	3,66	11025	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Linalool	0,42	12575	0,81	12558	0,44	12569	0,72	12592	0,55	12592	0,72	12575	0,73	12575
Terpinoleno	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,13	12017
Terpinen-4-ol	NE	NE	0,57	15542	NE	NE	0,61	15558	0,63	15558	0,57	15558	0,65	15558

QTD do composto (%): Quantidade do Composto e Porcentagem. IRR: Índice de retenção relativo. LGRA: *Lippia gracilis* Schauer.
NE: Não Encontrado.

Continuação da Tabela 3 - Constituintes químicos dos óleos essenciais das de *Lippia gracilis* Schauer.

	LGRA 106		LGRA 107		LGRA 108		LGRA 109		LGRA 110		LGRA 201		LGRA 202	
Composto	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)
cis-hidrato de Sabineno	0,21	11467	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Borneol	NE	NE	NE	NE	0,18	15233	NE	NE	NE	NE	0,58	15242	0,83	15242
Canfora	NE	NE	NE	NE	0,46	14306	0,31	14317	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Terpinen-4-ol	0,57	15550	NE	NE	0,58	15547	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Metil carvacrol	NE	NE	NE	NE	0,18	17667	0,23	17683	NE	NE	NE	NE	0,18	17683
α -Terpineol	0,33	16108	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Metil timol	8,32	17342	NE	NE	5,85	17339	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Timol	59,26	19600	4,51	19542	3,65	19547	3,21	19558	48,92	19558	5,79	19558	4,03	19588
Carvacrol	0,88	19861	43,24	19858	47,1	19867	49	19867	4,45	19867	35,29	19867	47,29	19867
b-Cariofileno	8,57	24011	6,2	24008	3,93	24008	7,77	24014	4,45	24017	6,26	24017	3,83	24017
a-trans Bergamoteno	0,22	12234	0,32	24450	0,26	24458	0,67	24475	0,36	24475	0,46	24475	0,25	24475
a-Humuleno	0,47	25200	0,84	25192	1	25197	0,38	25208	0,34	25208	0,5	25208	0,29	25208
Aromadrendeno	0,22	24633	0,4	24617	0,82	24622	0,61	24633	0,26	24633	0,29	24633	0,28	24633
Viridifloreno	0,23	26350	0,78	26350	1,03	26353	0,84	26358	0,28	26358	0,51	26358	0,43	26358

QTD do composto (%): Quantidade do Composto e Porcentagem. IRR: Índice de retenção relativo. LGRA: *Lippia gracilis* Schauer.

NE: Não Encontrado.

Continuação da Tabela 3 - Constituintes químicos dos óleos essenciais das de *Lippia gracilis* Schauer.

Composto	LGRA 106		LGRA 107		LGRA 108		LGRA 109		LGRA 110		LGRA 201		LGRA 202	
	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)	%	IRR (min)
Biciclogermacre no	0,21	13254	1,4	26500	1,95	26527	0,56	26517	0,39	26517	1,06	26517	0,42	26517
b-Bisaboleno	NE	NE	0,26	26908	NE	NE	0,54	26917	0,34	26917	0,23	26917	0,23	26917
Espatulenol	0,19	29067	0,62	29067	1,36	29070	0,58	29075	0,33	29075	0,7	29075	NE	NE
Oxido de Cariofileno	0,56	29233	0,58	29242	0,62	29245	0,72	29250	0,56	29250	0,82	29250	0,58	29250
7-epi-a-Selineno	NE	NE	0,66	27258	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Acetato de carvacrol	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,43	22767	NE	NE	NE	NE	0,46	22767
Spatulenol	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	0,48	29075
Não identificado	0,51	29617	0,91	30328	0,51	25945	0,58	25950	NE	NE	0,48	26177	0,64	26108
Não identificado	NE	NE	0,44	31733	0,46	26172	0,46	26183	NE	NE	0,19	29642	0,23	29633
Não identificado	NE	NE	0,76	26064	0,35	29367	0,55	29625	0,54	25950	NE	NE	NE	NE

QTD do composto (%): Quantidade do Composto e Porcentagem. IRR: Índice de retenção relativo. LGRA: *Lippia gracilis* Schauer.

NE: Não Encontrado.

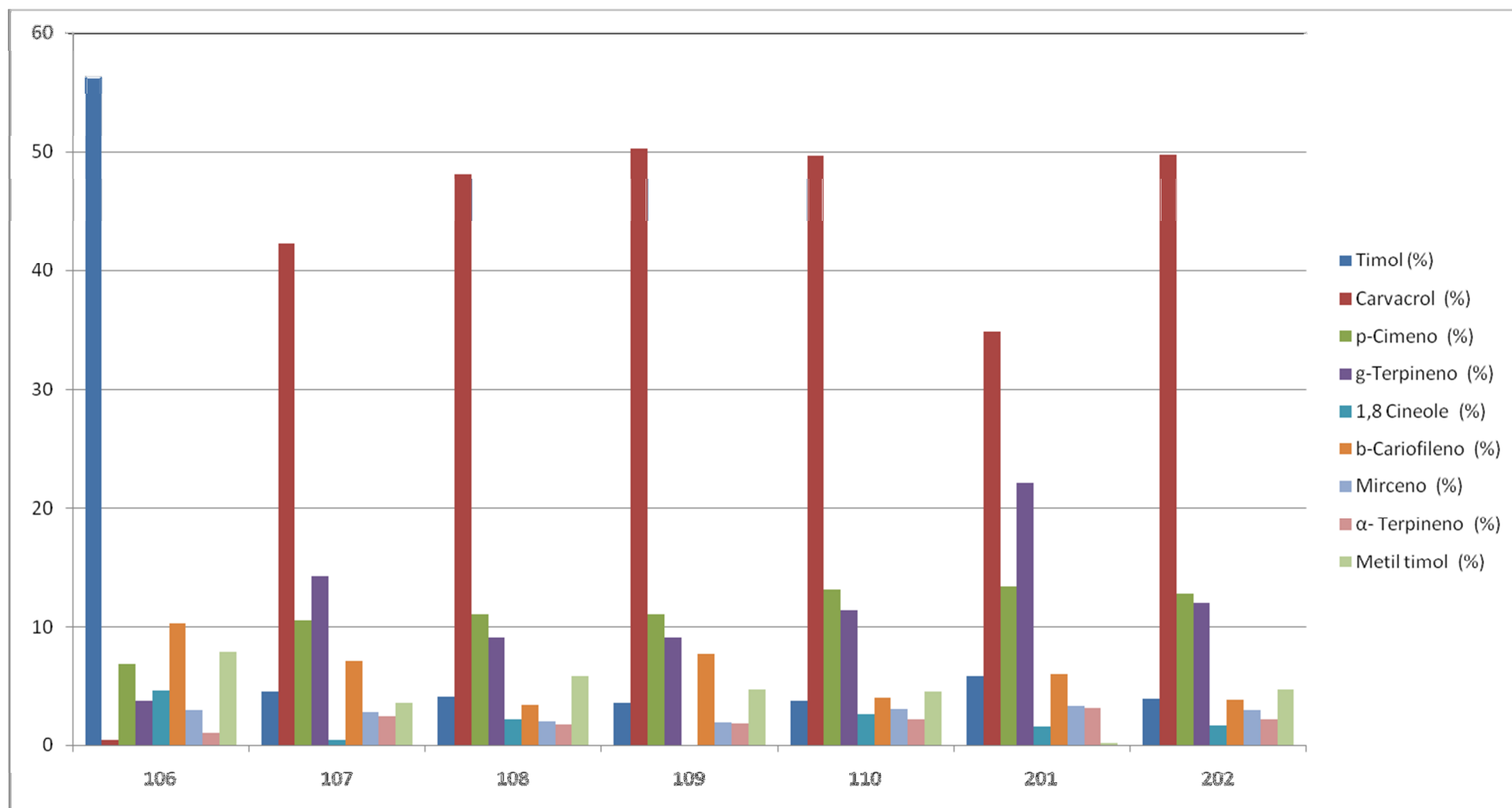


Figura 13—Constituintes químicos principais dos genótipos de óleos essenciais de *Lippia gracilis* Schauer.

O composto carvacrol foi o que apresentou maior percentual na maioria dos genótipos analisados, sendo nos óleos LGRA 107, LGRA 108, LGRA 109, LGRA 110, LGRA 201 e LGRA 202 encontradas porcentagens de 42,21%, 48,12%, 50,21%, 49,69%, 34,8% e 49,7%, respectivamente. O óleo LGRA 106 foi o que apresentou concentração muito baixa deste composto de 0,43%, sendo o timol o seu composto predominante com 56,32%. As porcentagens de timol nos óleos LGRA 107, LGRA 108, LGRA 109, LGRA 110, LGRA 201 e LGRA 202 foram de 4,43%, 4,02%, 3,57%, 3,72%, 5,81% e 3,86%, respectivamente. O composto p-cimeno foi encontrado nos óleos LGRA 106, LGRA 107, LGRA 108, LGRA 109, LGRA 110, LGRA 201 e LGRA 202, nas porcentagens de 6,83%, 10,5%, 11,05%, 11,03%, 13,1%, 13,36%, e 12,77. Os outros compostos apresentaram percentuais relativamente menores para todos os genótipos analisados. O 1,8- cineol não foi identificado no LGRA 109, o qual segundo Kokubo *et al.* (2004) apresenta importante atividade antimicrobiana, induzindo a perda de componentes celulares e inibindo a respiração microbiana.

Diferentemente deste trabalho, alguns pesquisadores têm obtido para outras espécies de *Lippia*, maior porcentagem de timol e menor de carvacrol. Botelho *et al.* (2007) obtiveram para o óleo de *Lippia sidoides* teores de timol, carvacrol e p-cimeno de 56,6%, 16,7%, 7,1%, respectivamente e Fontenelle *et al.*, 2007 encontraram para o mesmo óleo 59,6 de timol, 10,6 % de E-caryophyllene e 9,0% de p-cimeno. Já Owolabi *et al.*, 2009 tem encontrado em o óleo de *Lippia multiflora* teores de 1,8-Cineole e Sabinene de 60,5 e 16,9 %, respectivamente.

A sensibilidade das bactérias ao óleo essencial de *Lippia gracilis* pode estar relacionada a interações dos seus componentes majoritários, carvacrol e timol com os lipídeos da parede celular após a qual haveria desorganização na sua estrutura. Esta hipótese foi confirmada em estudos com *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* nos quais o timol e o carvacrol em concentrações inibitórias do crescimento microbiano desintegrou a membrana externa (KNOBLOCH *et al.*, 1988; LEMOS *etal.*, 1992). O caráter lipofílico destes monoterpenos cíclicos os conduzirá preferencialmente para a membrana citoplasmática. Isto resultará na expansão, aumento na fluidez membranar e inibição de enzimas ligadas à respiração celular (AGUIAR; MATOS, 1983).

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas dos compostos isolados timol, carvacrol, g-terpinemo e b-cariofileno e p-cimeno e os resultados estão demonstrados na

Tabela 4. O carvacrol foi o composto que apresentou maiores halos de inibição para todas as bactérias testadas, de 27 a 19mm, com exceção da *Escherichia coli*(gram -) e *Pseudomonas aeruginosa*(gram -), as quais não apresentaram inibição pelo carvacrol. O timol também apresentou inibição frente à maioria das bactérias testadas, com a formação de halos de 16 a 12 mm, entretanto para as bactérias *Serratia marcescens*(gram -), *Escherichia coli*(gram -) e *Pseudomonas aeruginosa*(gram -), não houve inibição do crescimento.

Para os demais compostos não houve formação de halos de inibição frente às bactérias testadas, sendo considerados compostos que não apresentam atividade antimicrobiana na concentração de 50 µL/mL. Apenas para a bactéria *Bacillus subtilis* (gram +) foi observada inibição com a formação de halo de 8,5mm, tanto para o g-Terpinemo, quanto para o b-Cariofileno, porém a inibição foi inferior à obtida com os outros compostos testados. O maior halo de inibição, 27 mm, foi obtido para o composto carvacrol frente à *Listeria monocytogenes*(gram +), seguido do *Bacillus subtilis* com halo de 26 mm. Observou-se que o *B. subtilis* (gram +) foi o micro-organismo que apresentou maior sensibilidade, pois se mostrou sensível a todos os compostos testados, com exceção do p-cimeno que não apresentou a formação de halo de inibição.

Pesquisadores têm demonstrado que o carvacrol afeta principalmente a parede celular das bactérias. O composto tende a tornar os componentes (proteínas e lipídeos) da membrana externa mais expostos à superfície causando um aumento na rugosidade da parede celular das bactérias gram negativas. Por outro lado a superfície das bactérias gram positivas tratadas com carvacrol aparece menos rugosa, porém mais irregular do que a das bactérias gram negativas. Uma hipótese para este efeito seria que o carvacrol se move através da camada de peptidoglicano e então age na membrana citoplasmática da célula. Além disto, tem sido observado que todas as células tratadas com carvacrol apresentam diminuição no tamanho, comprimento e diâmetro, tal efeito pode ser atribuído à perda de fluidos citosólicos das células (LA STORIA *et al*, 2011).

Ultee *et al.*,(1998) verificaram que o carvacrol, na concentração de 0,75 mmol/L, ou superior é bactericida contra patógenos de origem alimentar, como o *Bacillus cereus*. Os resultados mostraram que a fluidez da membrana é um fator importante que afeta a sensibilidade de *Bacillus cereus*(gram +) para carvacrol, mas

provavelmente não é o único fator. A atividade antimicrobiana do timol na concentração de 40 mg/mL foi também observada por Tippayatum e Chonhencho (2007), frente às espécies de bactérias, tais como *Listeria monocytogenes*(gram +), *Staphylococcus aureus*(gram +), *Bacillus cereus*(gram +), *Escherichia coli*(gram -).

Estudos realizados com outras espécies vegetais, cujo óleo essencial apresentava carvacrol e timol, na sua composição química, mostraram resultados similares aos obtidos neste trabalho. Óleos essenciais de *Origanum calcaratum* e *Origanum scabrum*, rico em carvacrol, foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (DEMETZOS *et al.*, 2001). Da mesma forma, os óleos extraídos a partir de duas espécies de *Thymus* inibiu o crescimento de *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae* (RASSOLI; MIRMOUSTAFA, 2003).

Tabela 4-. Média dos Diâmetros dos halos formados dos compostos testados na concentração de 50µL/mL

BACTÉRIA	Timol	Carvacrol	g-Terpineno	b-Cariofileno	p-Cimeno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12±2,1	17±1,4	6±0	6±0	6±0
<i>Bacillus cereus</i>	16±3,5	24±3,5	6±0	6±0	6±0
<i>Bacillus subtilis</i>	15±0	26±3,5	8,5±0,7	8,5±1	6±0
<i>Serratia marcescens</i>	6±0	14±2,1	6±0	6±0	6±0
<i>Escherichia coli</i>	6±0	6±0	6±0	6±0	6±0
<i>Listeria monocytogenes</i>	13±1,1	27±2,1	6±0	6±0	6±0
<i>Salmonella Enteritidis</i>	15±0	19±0	6±0	6±0	6±0

5.2. Atividade antimicrobiana dos genótipos de óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais frente às bactérias *Escherichia coli*(gram -), *Staphylococcus aureus*(gram +), *Salmonella Enteritidis*(gram -), *Bacillus cereus*(gram +), *Pseudomonas aeruginosa*(gram -), *Listeria monocytogenes* (gram +), *Bacillus subtilis*(gram +) e *Serratia marcescens*(gram -) foi determinada pela técnica de difusão em discos, e os resultados dos halos de inibição estão demonstrados na Tabela 5. Observou-se que o óleo LGRA 106 apresentou halos de inibição de 7,1 a 9,9 mm, para todas as bactérias testadas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*. O LGRA 107 apresentou halos de inibição de 7,0 a 10,0 mm, para todas as bactérias testadas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, já o LGRA 110 os halos apresentaram de 6,5 a 9,7 mm para todas as bactérias testadas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*. Para as bactérias testadas, os óleos LGRA 108, LGRA 109, LGRA 201 e LGRA 202 apresentaram halos de inibição menores do que os obtidos com os óleos LGRA 106, LGRA 107 e LGRA 110.

Nenhum dos genótipos testados apresentou atividade antimicrobiana frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Para os óleos LGRA106, LGRA107, LGRA108 e LGRA110, LGRA201 os maiores halos de inibição foram obtidos para as bactérias *Serratia marcescens* (halos de 9,0 a 10 mm) e *Bacillus cereus* (halos de 7,5 a 9,9 mm). A maior atividade antimicrobiana foi o óleo LGRA 107 frente à bactéria *S. marcescens*, onde se obteve halo de inibição de 10 mm. O LGRA 109 foi o óleo que apresentou menor inibição frente às bactérias testadas, pois só formou halo de inibição (8 mm) para

apenas uma bactéria a *S. marcescens*. Dantas *et al.* (2010) obteve para o *Lippia gracilis* não-diluído, halos de inibição maiores do que os obtidos neste trabalho, sendo 34, 36 e 40 mm frente às bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermis*, respectivamente. Neto *et al.* (2010) obteve para o *Lippia gracilis* Schauer halos de inibição de 26 e 25 mm frente ao *Staphylococcus aureus*, nas concentrações 10 e 5% (v/v) respectivamente.

Segundo Burt (2004) a maioria dos estudos que investigam a ação dos óleos essenciais em relação aos micro-organismos patogênicos em alimentos concordam que, geralmente, os óleos são ligeiramente mais ativos para as bactérias Gram-positivas do que para as Gram-negativas. As espécies Gram-negativas são menos susceptíveis à ação dos óleos essenciais devido à existência de uma membrana externa que circunda a parede celular, a qual restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. No entanto, neste estudo os óleos essenciais de *Lippia gracilis* foram mais eficazes tanto para bactérias gram + como gram – tendo em vista que os maiores halos foram obtidos para a *Serratia marcescens* (gram +) e o *Bacillus cereus* (gram –). Pesquisadores como Ushimaru *et al.* (2007) verificaram que extratos metanólicos de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) foram mais eficazes frente às bactérias gram+ e extratos metanólicos de alho (*Allium sativum* L.) frente às bactérias gram-.

Tabela 5- Atividade antimicrobiana dos Óleos Essenciais de *Lippia gracilis* e dos controles positivos e negativos.

BACTÉRIA	Média dos Diâmetros dos Halos (mm)										
	GENÓTIPOS (50 µL/mL)							CONTROLES			
	LGRA 106	LGRA 107	LGRA 108	LGRA 109	LGRA 110	LGRA 201	LGRA 202	TET* (+)	CLO* (+)	GEN* (+)	TWEEN 1%(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	14,0±11,3	10,5±6,4	8,0±2,8	6,0±0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,0±0,8	7,8±0,5	6,8±0,5	6,3±0,5	8,0±0,8	7,0±1,4	6,5±0,4	26,5±2,1	27,5±3,5	26,5±4,9	6,5±0,7
<i>Bacillus cereus</i>	9,9±3,2	9,3±1,7	8,4±1,8	6,5±0,6	9,5±3,0	7,5±1,7	6,0±0,0	24,5±12,0	25,5±0,7	24,0±11,3	6,0±0,0
<i>Bacillus subtilis</i>	7,3±1,2	6,0±0,0	7,7±1,2	6,3±0,6	8,0±1,7	6,7±1,2	7,0±1,7	22,0±0,0	24,0±0,0	25,0±0,0	6,5±0,7
<i>Serratia marcescens</i>	9,7±1,2	10,0±1,7	8,3±0,6	8,0±1,0	9,7±0,6	9,3±0,6	9,0±0,0	13,5±2,1	27,0±2,8	17,0±4,2	6,0±0,0
<i>Escherichia coli</i>	7,1±1,4	6,0±0,0	6,0±0,0	6,0±0,0	6,5±0,6	6,0±0,0	6,0±0,0	12,5±9,2	24,0±1,4	8,5±3,5	6,0±0,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	9,3±0,6	7,7±1,5	7,7±0,6	6,0±0,0	6,7±1,2	6,0±0,0	6,3±0,6	31,5±3,5	25,5±4,9	25,0±0,0	6,0±0,0
<i>Salmonella Enteritidis</i>	7,3±1,3	7,0±0,8	6,5±0,6	6,0±0,0	6,5±1,0	6,9±1,0	6,0±0,0	22,5±0,7	14,5±12,0	26,5±4,9	6,0±0,0

LGRA: *Lippia gracilis* Schauer. *TET = tetraciclina, CLO* = cloranfenicol, GEN* = gentamicina.

Os óleos de *Lippia gracilis* Schauer 106, 107 e 110 foram os que apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente à maioria das bactérias testadas, portanto foram selecionados para a realização das misturas de óleos.

A atividade antimicrobiana de cada óleo foi avaliada nas concentrações 20 µL, 50µL, 80µL e 100 µL, os resultados estão demonstrados na Tabela 6. Menor atividade antimicrobiana foi obtida quando utilizado óleos na concentração de 20 µL/mL frente às bactérias testadas, para todos os genótipos. Para o LGRA 106 nas concentrações acima 20 µL/mL, os valores não diferem entre si estaticamente, sendo a média dos halos de inibição de 8,0 mm para concentração de 50 µL/mL, 8,5 mm para a de 80 µL/mL e 8,7 mm para a de 100 µL/mL, para todas as bactérias testadas. Para os óleos LGRA 107 e 110 verificou-se que os maiores halos inibitórios formados frente à todas as bactérias foram obtidos em concentrações ≥ 80 µL/mL. Na concentração de 80 µL/mL a média dos halos de inibição foi de 8,6 mm e 9,5 mm e na concentração de 100 µL/mL a média foi de 9,2 mm e 10,8 mm, para os óleos LGRA107 e LGRA110, respectivamente. Por outro lado, os halos de inibição destes óleos nas concentrações de 20µL/mL e 50µL/mL não diferiram entre si estaticamente ao nível de 5% de significância.

O óleo LGRA 106 apresentou maiores halos frente às bactérias testadas, nas concentrações de 20 µL/mL e 50 µL/mL média de todas as bactérias de 6,9 e 8,1 mm respectivamente, entretanto quando a concentração foi aumentada para 80 µL/mL e 100 µL/mL o óleo LGRA 110 apresentou halos de inibição maiores, com valores máximos de 12 mm para o *Bacillus cereus*(gram +) e 16 mm para a *Listeria monocytogenes* (gram +), respectivamente. A bactéria *B. cereus* foi a que apresentou maior sensibilidade ao óleo LGRA 106 na concentração de 100 µL/mL com halo de inibição 11,7 mm e ao óleo LGRA 107 na mesma concentração na qual se obteve halo de inibição de 16 mm. O *Bacillus subtilis* (gram +)apresentou maior sensibilidade ao óleo LGRA 110, tendo apresentado nas concentrações de 20, 50, 80 e 100 µL/mL, halos de inibição de 8,3mm, 8,0 mm e 11,7 mm e 15,7mm respectivamente.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*(gram -) foi a única que não apresentou sensibilidade a nenhum óleo testado, em nenhuma das concentrações. Pesquisadores também tem relatado a resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos (CHEN *et al.*, 1995, ZIHA-ZARIFI *et al.*, 1999, JONES *et al.*, 2000, PAVIANI *et al.*,

2004). Em relação aos controles positivos, observou-se que há uma formação de halos inibitórios maiores do que os halos formados pelos genótipos, chegando até a 26,5 mm.

Tabela 6.Diâmetro dos halos de inibição em (mm) na concentração de 20, 50, 80 e 100µL/mL dos Óleos Essenciais de *Lippia gracilis*.

BACTÉRIA	Média dos Diâmetros dos Halos (mm)											
	Concentrações testadas											
	LGRA 106 (µL/mL)				LGRA 107 (µL/mL)				LGRA 110 (µL/mL)			
	20	50	80	100	20	50	80	100	20	50	80	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0±0,0 ^a	6,0±0,0 ^b	6,0±0,0 ^b	6,0±0,0 ^b	6,0±0,0 ^b	6,0±0,0 ^b	6,0±0,0 ^{a b}	6,0±0,0 ^a	6,0±0,0 ^c	6,0±0,0 ^{bc}	6,0±0,0 ^{a b}	6,0±0,0 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,3±0,6 ^a	8,0±0,8 ^b	7,7±0,6 ^b	8,0±0,0 ^b	6,7±1,2 ^b	7,8±0,5 ^b	7,7±0,6 ^{a b}	8,3±0,6 ^a	6,0±0,0 ^c	8,0±0,8 ^{bc}	7,0±1,0 ^{a b}	7,7±0,6 ^a
<i>Bacillus cereus</i>	7,7±0,6 ^a	9,9±3,2 ^b	10,7±1,2 ^b	11,7±5,7 ^b	7,3±0,6 ^b	9,3±1,7 ^b	10,7±1,2 ^{a b}	16,0±3,5 ^a	6,3±0,6 ^c	9,5±3,0 ^{bc}	12,0±3,0 ^{a b}	14,0±1,7 ^a
<i>Bacillus subtilis</i>	7,3±0,6 ^a	7,3±1,2 ^b	9,3±1,2 ^b	10,7±3,2 ^b	6,7±0,6 ^b	6,0±0,0 ^b	9,7±3,8 ^{a b}	11,0±1,0 ^a	8,3±1,5 ^c	8,0±1,7 ^{bc}	11,7±2,3 ^{a b}	15,7±3,8 ^a
<i>Serratia marcescens</i>	7,3±0,6 ^a	9,7±1,2 ^b	8,7±1,2 ^b	8,3±1,2 ^b	7,0±0,0 ^b	10,0±1,7 ^b	7,3±0,6 ^{a b}	9,3±1,2 ^a	7,0±0,0 ^c	9,7±0,6 ^{bc}	9,0±1,0 ^{a b}	9,0±0,0 ^a
<i>Escherichia coli</i>	7,0±0,0 ^a	7,1±1,4 ^b	7,7±0,6 ^b	7,7±1,5 ^b	6,0±0,0 ^b	6,0±0,0 ^b	8,3±0,6 ^{a b}	8,7±0,6 ^a	6,0±0,0 ^c	6,5±0,6 ^{bc}	9,0±1,0 ^{a b}	9,3±0,6 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	7,0±0,0 ^a	9,3±0,6 ^b	8,7±0,6 ^b	8,3±2,1 ^b	6,7±0,6 ^b	7,7±1,5 ^b	9,3±2,1 ^{a b}	8,0±1,7 ^a	6,3±0,6 ^c	6,7±1,2 ^{bc}	10,7±1,5 ^{a b}	16,0±5,2 ^a
<i>Salmonella Enteritidis</i>	6,3±0,6 ^a	7,3±1,3 ^b	9,7±0,6 ^b	9,3±1,2 ^b	7,3±1,2 ^b	7,0±0,8 ^b	10,0±1,0 ^{a b}	9,3±0,6 ^a	6,7±0,6 ^c	6,5±1,0 ^{bc}	8,7±1,2 ^{a b}	9,3±2,1 ^a

LGRA: *Lippia gracilis* Schauer. As médias dos halos acompanhadas pelas letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de

Tukey, sendo a= ab e b=ab/ b=bc e c=bc.

5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima(CBM)

A CIM e CBM dos óleos essenciais de LGRA 106 e LGRA 107 frente às bactérias *Escherichia coli*(gram -), *Staphylococcus aureus*(gram +), *Salmonella Enteritidis*(gram -), *Bacillus cereus*(gram +), *Pseudomonas aeruginosa*(gram -), *Listeria monocytogenes*(gram +), *Bacillus subtilis* (gram +) e *Serratia marcescens*(gram -) foi determinada pela técnica de microdiluição e os resultados estão demonstrados na Tabela 7. Para o óleo LGRA106 e LGRA107 obteve-se valores de CIM e CBM de 200 e 400 µg/mL, respectivamente, para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (gram -) e *Staphylococcus aureus* (gram +). Para as cepas de *Escherichia coli* (gram -) e *Salmonella Enteritidis* (gram -) os valores de CIM e a CBM do óleo LGRA106 foram maiores que 400 µg/mL para ambos os micro-organismos, já para o óleo LGRA 107 os valores de CIM foram de 200 e maiores que 400 µg/mL, respectivamente e os valores de CBM foram maiores 400 µg/mL para ambos os micro-organismos. Para o *Bacillus cereus* os valores da CIM dos LGRA106 e LGRA 107 foi de 200 e 100 µg/mL e os valores da CBM foram maiores que 400 e 400 µg/mL, respectivamente. Os valores de CIM dos óleos LGRA 106 e 107 foram 0,78 e 100 µg/mL para as bactérias *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*, respectivamente. Por outro lado, os valores de CBM do LGRA 106 foram maiores que 400 µg/mL para ambas as bactérias e para o LGRA 107 foram 3,13 e maior que 400 µg/mL para *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*, respectivamente. Ambos os óleos apresentaram CIM de 0,78 µg/mL para *Listeria monocytogenes*, porém os valores de CBM foram de 3,13 e maior que 400 µg/mL, para o LGRA 106 e LGRA 107, respectivamente.

Tabela 7 - Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima dos genótipos LGRA106 e LGRA107 do óleo essencial de *Lippia gracilis*.

BACTÉRIA	LGRA ^C 106 (µg/mL)		LGRA ^C 107 (µg/mL)	
	CIM ^a	CBM ^b	CIM ^a	CBM ^b
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200	400	200	400
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	400	200	400
<i>Bacillus cereus</i>	200	>400	100	400
<i>Bacillus subtilis</i>	0,78	>400	0,78	3,13
<i>Serratia marcescens</i>	100	>400	100	>400
<i>Escherichia coli</i>	>400	>400	200	>400
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,78	3,13	0,78	>400
<i>Salmonella Enteritidis</i>	>400	>400	>400	>400

CIM^a = concentração inibitória mínima; CBM^b = concentração bactericida mínima. LGRA^C: *Lippia gracilis* Schauer.

Neste trabalho, os valores de CIM dos genótipos LGRA106 e LGRA107 para o *B. cereus* de 200 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente foram menores do que os obtidos por Albuquerque, *et al.* (2006), os quais encontraram CIM de 420µg/mL para este micro-organismo utilizando óleo de *Lippia gracilis*. Owolabi *et al.* (2009) com a *Lippia multiflora* determinou valores de CIM de 1250 µg/mL para os micro-organismos *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, esse valor foi maior do que o obtido neste trabalho, onde os valores de CIM do LGRA 106 foram de 200µg/mL para ambos micro-organismos e do LGRA 107 foi de 100 µg/mL para o *Bacillus cereus*. Vale ressaltar que o valor encontrado para *Listeria monocytogenes* é bem abaixo dos valores encontrados na literatura para o mesmo óleo que não sofreu processo de melhoramento genético, já que Dantas *et al.* (2010) encontrou valor de CIM de *Lippia gracilis* de 20µg/mL para este micro-organismo, enquanto que neste trabalho o valor foi menor sendo de 0,78 µg/mL de LGRA 106 e LGRA 107, também para a *Listeria monocytogenes* e para o *Bacillus subtilis*, sendo uma dado importante para aplicações futuras desses óleos essenciais como antimicrobianos naturais em alimentos, pois com a utilização de menores concentrações do óleo essencial, o sabor residual nos alimentos poderia ser minimizado.

5.4. Atividade antimicrobiana das Misturas dos Óleos

As misturas dos genótipos LGRA106, LGRA107 e LGRA110 foram preparadas utilizando os volumes de 20, 50, 80 e 100 µL e atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da técnica de difusão em discos. Observou-se que os maiores halos formados contra as bactérias *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* foram obtidos para a mistura 11 e contra a *Serratia marcescens* e *Listeria monocytogenes* foram obtidos para a mistura 10, as quais continham 100 µL de LGRA 106, 50 µL de LGRA 107 e 50 µL de LGRA 110 para mistura 10 e para mistura 11, 50 µL LGRA 106, 100 µL de LGRA 107 e 50 µL de LGRA 110. Entretanto para a *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* os maiores halos formados foram obtidos para as misturas 3 e 5. *Staphylococcus aureus* para mistura 5, as quais continham 20 µL de LGRA 106, 20 µL de LGRA 107 e 80 µL de LGRA 110 para mistura 3 e para mistura 5, 20 µL LGRA 106, 80 µL de LGRA 107 e 80 µL de LGRA 110. A *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou nenhuma sensibilidade a

nenhuma das misturas de óleos testadas, resultado também já observado com os óleos isolados.

Quando realizada diferentes combinações dos óleos LGRA 106, LGRA 107 e LGRA 110 obteve-se maiores halos de inibição frente às bactérias testadas do que quando utilizado os óleos isolados. Provavelmente esse aumento do poder de inibição das misturas em relação aos óleos isolados deve-se ao fato de que com a mistura dos óleos, há um aumento da quantidade de composto que exercem a ação antimicrobiana nos óleos testados, como o carvacrol e timol, principalmente (LAMBERT *et al.*, 2001; VARDAR- UNLU *et al.*, 2003; BAYDAR *et al.*, 2004).

No grupo 1 (misturas de 1 a 6), onde se utilizou combinações dos óleos em volumes de 20 e 80 µL, obteve-se maior inibição das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* nas misturas contendo maior volume de LGRA 106 (mistura 1) e LGRA 107 (mistura 2), respectivamente. Para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis a maior inibição foi na mistura 3 a qual continha maior quantidade de LGRA 110. Para *Escherichia coli* a maior inibição foi com a mistura 5, contendo maiores quantidades de LGRA 107 e LGRA 110 e para a *Serratia marcescens* e *Listeria monocytogenes* a mistura 6, contendo maiores quantidades de LGRA 106 e LGRA 107 provocou maior inibição. Tendo em vista que os óleos LGRA 107 e LGRA 110 contêm como componentes principais o carvacrol, e o LGRA 106 o timol, os maiores volumes destes óleos nas misturas tem contribuindo para aumentar a sinergia entre esses compostos promovendo uma maior atividade antimicrobiana.

No grupo 2, onde se utilizou combinações dos óleos em volumes de 0 e 50 µL, os maiores halos de inibição foram para as bactérias *Staphylococcus aureus* (20,3 mm) e *Bacillus cereus* (23,4 mm), com as misturas 7 (LGRA107 e LGRA110) e 9 (LGRA106 e LGRA107), respectivamente.

No grupo 3 os maiores halos de inibição foram obtidos com a mistura 10, a qual continha 100 µL de LGRA106 para as bactérias *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* *Listeria monocytogenes* e com a mistura 11 a qual continha 100 µL de LGRA 107 para as bactérias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis. Neste grupo os maiores volumes dos óleos LGRA 106 e LGRA 107, os quais contêm timol e carvacrol como componentes principais foram os que mais influenciaram para o aumento do potencial antimicrobiano das misturas.

Tabela 8–Diâmetro dos halos de inibição em (mm) das misturas dos Óleos Essenciais de *Lippia gracilis*.

Média dos Diâmetros dos Halos (mm)												
Grupo	LGRA**											
	MISTURAS	106 (µL)	107 (µL)	110 (µL)	BAC1*	BAC2*	BAC3*	BAC4*	BAC5*	BAC6*	BAC7*	BAC8*
1	1	80	20	20	6±0	17,3±2,1	20,7±5	16±6	11,3±1	10,8±1	16±3	13,3±1
	2	20	80	20	6±0	24,8±2,5	26±5,2	15,5±3	11,4±2	13±4	17,3±3	13,8±3
	3	20	20	80	6±0	25,3±4,3	19,1±4,3	13,8±1	10,3±3	11,8±1	15,5±3	17,3±2
	4	80	20	80	6±0	21,8±1,7	23,5±3,4	15,3±4	10,5±3	11±1	19,4±6	14,8±4
	5	20	80	80	6±0	22,5±4,4	21,8±7	13,8±4	10,9±3	13,5±3	19±4	16,5±2
	6	80	80	20	6±0	21,6±4	25,1±11	14,6±3	11,5±2	12±5	20,1±7	14,3±3
2	7	0	50	50	6±0	20,3±1,9	17,8±5,2	12,9±4	11,8±1	8,8±2	18,1±6	12,5±2
	8	50	0	50	6±0	17,5±2,4	14,6±4,9	14±4	11,3±1	11±3	19,8±4	12,4±2
	9	50	50	0	6±0	16,8±6,2	23,4±8,8	14,5±1	10±3	10,5±3	16,5±4	12,3±2
	10	100	50	50	6±0	22,5±2,1	20,8±6,9	16,3±3	12±1	12,5±2	23,5±3	13,8±1
3	11	50	100	50	6±0	23,8±10	27±9,5	16,8±4	10,4±3	10±1	14,8±9	15,5±3
	12	50	50	100	6±0	17,6±6,7	21,5±7,3	16,3±4	8,8±3	9,5±1	15±3	13,5±3
	13	50	50	50	6±0	17±6,4	24,5±8,2	15,5±1	11,5±1	12,3±3	19,9±9	14,5±4

*BAC 1: *Pseudomonas aeruginosa*, BAC 2: *Staphylococcus aureus*, BAC 3: *Bacillus cereus*, BAC 4: *Bacillus subtilis*, BAC 5: *Serratia marcescens*, BAC 6: *Escherichia coli*, BAC 7: *Listeria monocytogenes*, BAC 8: *Salmonella Enteritidis*; **LGRA: *Lippia gracilis* Schauer,.

6. CONCLUSÕES

Os principais componentes encontrados nos genótipos foram o timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpinemo, 1,8- cineole, β - cariofileno, mirceno, α - terpinemo e metil timol, sendo o carvacrol o composto de maior quantidade encontrado em seis dos genótipos analisados. Os micro-organismos *Bacillus cereus* (Gram +) e *Serratia marcescens* (Gram-) foram os que apresentaram maior inibição aos genótipos na concentração de 50 μ L/mL, sendo o LGRA106, LGRA 107 e LGRA110, que demonstraram maior potencial antimicrobiano. A *Pseudomonas aeruginosa* (gram -) foi o único micro-organismo que não apresentou inibição a nenhum dos genótipos testados.

Os genótipos LGRA 106, LGRA107 e LGRA 110 apresentaram as menores concentrações inibitórias mínimas para os microrganismos *Bacillus subtilis* e *Listeria monocytogenes*. As menores concentrações bactericidas mínimas foram obtidas com os óleos LGRA 106 e LGRA 107 frente à *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*, respectivamente. As misturas dos óleos LGRA106, LGRA107 e LGRA 110 potencializaram a atividade antimicrobiana em relação aos óleos isolados, entretanto nenhuma inibição foi obtida para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Contudo foi demonstrado que os genótipos LGRA 106, 107 e 110 , bem como suas misturas, apresentam potencial como agente antimicrobiano *in vitro* frente à bactérias patogênicas contaminantes de alimentos.

7. Perspectivas

- Avaliar o potencial antimicrobiano dos genótipos de *Lippia gracilis in situ* em alimentos como carnes e frutas e verificar a influência destes óleos nas características físico-químicas e sensoriais dos produtos;
- Realizar a análise cromatográfica das misturas dos óleos para identificar quais compostos foram responsáveis pelo aumento do potencial antimicrobiano;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos genótipos de *Lippia gracilis* frente a fungos filamentosos e não filamentosos;
- Realizar estudos futuros de viabilidade econômica para aplicação de misturas de óleos como agentes antimicrobianos em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P.. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Illinois: Allured Publishing**, 1995, p. 456.
- AGUIAR, L. B. M. A; MATOS, F. J. A. Atividade antibiótica de plantas medicinais da flora nordestina. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 464, 1983.
- ALBUQUERQUE, C. C. **Ação do óleo essencial *L. gracilis* Schauer sobre fungos contaminantes do ar e bactérias endofíticas cultivadas de helicônias *in vitro***. 2005. 85 f. Tese (Doutorado em Botânica)-Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco. 2005.
- ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. DE L. R.; WILLADINO, L.; JÚNIOR, C. M.; ULISSES, C.. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. Ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, 2006.
- AVATO, P.; FORTUNATO, I. M.; RUTA, C.; D'ELIA, R.; Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Sci.** v. 169, p. 29-36, 2005.
- AZEREDO, G. A. DE; STAMFORD, T. L. M., NUNES, P. C.; NETO, N. J. G.; OLIVEIRA, M. E. G. DE; SOUZA, E. L. DE Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. **Food Research International**, v. 44, p. 1541–1548, 2011.

BAGAMBOULA, C.F., UYTENDAELE, M., DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**.v.21, p.33–42, 2004.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chemical and Toxicology**, v.46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, L. N; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H.; USHIMARU, P. I.; PROBST I. DA S; FERNANDES A. JR.. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 725-28, 2009.

BARBOUR, E.; SHARIF, M. A. L.; SAGHERIAN, V. K.; HABRE A. N.; TALHOUK, R. S.; TALHOUK, S. N.. Scening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.1-7, 2004.

BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; KARADOĞAN, T.. Antimicrobial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169–172, 2004.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. DE L.; MENEZES, E. A.; MORAIS S, M.DE;CUNHA, F. A.; BARREIRA, E. S. C. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, p.80-83, 2005.

BLACK, J.G. **Microbiologia Fundamentos e Perspectivas**. 4^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C.. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian journal of medical and biological**.v.40, p. 349-356. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Resolução nº 12. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2 de janeiro 2001.

BURT, S.. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review." **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

BUSATTA, C., VIDAL, R.S., POPIOLSKI, A.S., MOSSI, A.J., DARIVA, C., RODRIGUES, M.R.A., CORAZZA, F.C., CORAZZA, M.L., OLIVEIRA, J.V., & CANSIAN, R.L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 207- 211, 2008.

BUSATTA, C.. **Caracterização química e atividade antimicrobiana “in vitro” e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110f. Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim, 2006.

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.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A; RILEY, T.V.. In vitro activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* against *Streptococcus spp.* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.37, p. 1177–1181, 1996.

CASSEL, E. ; VARGAS, R. M. F.. Proceso industrial de destilación por arrastre a vapor de aceite esencial de romero. **Revista de investigacion**, v. 01, p. 11-18, 2008.

CAVALCANTI, M. A. Q.; OLIVEIRA, L. G.; FERNANDES, M. J.; LIMA, D. M. Fungos filamentosos isolados do solo em municípios da região Xingó, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v. 20, p.831-837, 2006.

CAVALCANTI, V. O.. **Atividade antimicobacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer**. 2006. 61f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pernambuco, PE. 2006.

CHEN, H.Y.; YUAN, M.; IBRAHIM-ELMAGBOUL, I.B.,; LIVERMORE, D.M. National survey of susceptibility to antimicrobials amongst clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v.35, n.4, p.521-34, 1995.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G.. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.* and *Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 01, p. 39- 44, 2003

DAL POZZO, M., VIÉGAS, M. J.; SANTURIO, D. F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I. H.; ALVES, S. H.; COSTA, M. M. DA. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp* isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, 2011.

DAMBOLENA, J. S.; ZUNINO, M. P.; LÓPEZ A. G.; RUBINSTEIN, H. R.; ZYGADLO J. A.; MWANGI, J. W.; THOITHI, G. N.; KIBWAGE, I. O.; MWALUKUMBI, J. M.; KARIUKI, S. T.. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 2, p. 410-414, 2010.

DANTAS, L. I. S.; ROCHA, F. Â. G. DA; MEDEIROS F. G. M. DE; SANTOS, J. A. B. DOS.. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **Holos**, v. 5, ano 26, 2010.

DELAMARE, A. P. L.; PISTORELLO, I. T. M.; ARTICO, L.; SERAFINI, L. A.; ECHEVERRIGARAY, S.. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia ofcinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food and Chemistry**, v.100, p.603-608, 2007.

DELAQUIS, P.J., STANICH, K., GIRARD, B., MAZZA, G.. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**. v. 74, p. 101–109. 2002.

DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. K; TAN, K. Composition and antimicrobial studies of the oils of *Origanum calcaratum* Juss. and *O. Scabrum* Boiss. Et Heldr. form Greece. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 460-462, 2001.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M.. Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. **Pharmazie**, v. 48, p. 301–304, 1993.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J ; MONTAÑÉS, L ; DJERBAL, M ; RONCALÉS, P.. Antimicrobial activity of *Pistacialentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**, v. 22, p. 1046 – 1053, 2011.

ELOFF, J.N. A.. Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, v.64, p.711- 713, 1998.

FONTENELLE, R. O. S., MORAIS, S. M., BRITO, E. H. S., KERNTOPF, M. R., BRILHANTE, R. S. N., CORDEIRO, R. A., TOMÉ, A. R., QUEIROZ, M. G. R., NASCIMENTO, N. R. F., SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G.. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.934–940.2007.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A... Evaluation of anti listerial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 83–92, 2002.

GUTIERREZ, J; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P.. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142–150, 2009.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P.. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91–97, 2008.

GUTIERREZ, J.; BOURKE, P.; LONCHAMP, J.; BARRY-RYAN, C.. Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, p. 195–202, 2009.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985–990, 1999.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I. E.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A.. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal Agriculture Food Chemistry**.v.46, n.9, p.3590-3595, 1998.

HÖFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M.. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.459-464, 2009.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D.. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273–292, 2005.

HUSSAIN, A.I., ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H.; PRZYBYLSKI, R.. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food and Chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008.

JAKIEMIU, E. A. R.. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus Vulgaris* L.)**. 2008. 90f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, PR. 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: ARTMED, 2005.

JONES, R.N.; KIBY, J.T.; BEACH, M.L.; BIEDENBACH, D.J.; PFALLER, M.A. Geographic variations in activity of broad-spectrum lactams against *Pseudomonas aeruginosa*: summary of the world wide SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.43, n.3, p. 239-43, 2002.

KNOBLOCH, K. PAULI, A; IBERL, B; WEIS, N; WEIGAND, H. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. **Journal Essential Oils Research** v.1, p. 119-128, 1988.

KOKUBO, R.; TAKAHASHI, T.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 60-64, 2004.

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C.C., TAOUKIS, P. S.; NYCHAS. G.-J.E.. Modeling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella* Enteritidis as a

function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p. 981-987, 1998.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E.. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p.453–462, 2001.

LA STORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F. B.; PASQUA, R. DI; VILLANI, F.; MAURIELLO, G.. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 164 – 172, 2011.

LEAL, L. K. A. M.; OLIVEIRA, V. M.; ARARUNA, S. M.; MIRANDA, M. C. C.; OLIVEIRA, F. M. A.. Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 09-11, 2003.

LEMO, T.L.J.; MONTE, F.J.Q.; BARBOSA, R.C.B.; LIMA, E.O.. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa - SP, 2002.

LU, F.; DING, Y.; YE, X.; DING, Y.. Antibacterial Effect of Cinnamon Oil Combined with Thyme or Clove Oil. **Agricultural Science in China**, v. 10, p. 1482-1487, 2011.

MARCELINO-JR., C. A. C.; BARBOSA, R. M. N. ; CAMPOS, A. F.; SANTOS, A. P.; LACERDA, C. C.; SILVA, CARLOS, E. G.. Utilizando uma cuscuzeira extração de óleo essencial do alecrim-da-chapada (*Lippia gracilis*), uma planta da caatinga. **Química Nova Na Escola**, v.22, 2005.

MARINHO, M.J.M.; ALBUQUERQUE, C.C.; MORAIS, M.B.; SOUZA, M.C.G.; SILVA, K.M.B. Estabelecimento de protocolo para micropropagação de *Lippia gracilis* Schauer. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.2, p.246-252, 2011.

MATOS, F.J.A; MACHADO, M. I. L; CRAVEIRO, A. A; ALENCAR, J. W; SILVA, M. G. V. Medicinal plants of north east Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. And *Lippia gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). **Journal Essential Oil Research**, v. 11, p. 666-668, 1999.

MELO, J. I. M.; ALVES, I.DE M.; SOUSA, R. T. M.DE; BARBOSA, L. M. M. A.; ANDRADE W. M.DE. Verbenaceae *sensu lato* em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 41-47, 2010.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa.** 2004. 72p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras – MG, 2004.

MOUREY, A.; CANILLAC, N.. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, p. 289–292, 2002.

MOYNA, P.; DELLACASSA, E.; MENÉDEZ, P.. Técnicas analíticas aplicadas aos óleos essenciais. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria.** Caxias do Sul: EDUCS, p.167-193, 2002.

NCCLS/CLSI - **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco—difusão:** Norma Aprovada – Nona Edição. Documento M2-A9 VOL.26 Nº 1. Substitui a Norma M2-A8. V. 23 Nº 1. 2003.

NCCLS/CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).**Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals;** Approved Standard.3.ed. Wayne, PA,. (CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory

Standards Institute). M31- A3,V.28, N°8, 2008 Substitui a Norma M31-A 2 VOL. 22 N° 6. 2008.

NENOFF, P.; HAUSTEIN, U.F.; BRANDT, W.. Antifungal activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi in vitro. **Skin Pharmacology**, v. 9, p. 388–394, 1996.

NETO, R. M.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, V. S.; MELO, M. C. N. DE; CARVALHO, C. B. M., GUIMARÃES, S. B.. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats **Brazilian Journal of Pharmacognosy**., Curitiba, v. 20, n. 2, p.261-266, 2010.

NOVACOSK, R.; TORRES R. S. L. A.. Atividade antimicrobiana sinérgica entre óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinalis*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), cedro (*Juniperus virginiana*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, n.21, p. 36-39, 2006.

OKOH O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A. J.. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydro distillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v, 120, p.308-312, 2010.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; DAISE LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G.. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná. **Brazilian Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, O. R.; TERAPO, D.; CARVALHO, A.C. P. P.; INNECCO, R.; ALBUQUERQUE, C. C.. Effect of essential oil from genus *Lippia* plants over the control of fungi contaminants on the micro propagation of plants. **Rev. Ciên. Agron.**, Fortaleza, v.39, n.01, p.94-100, jan.-mar., 2008.

OLIVEIRA R. A. G. DE; LIMA E. O.; VIEIRA W. L.; TRAJANO V. N.; LIMA I. O.; SOUZA E. L., TOLEDO M. S.; SILVA-FILHO R. N.. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 77-82, 2006.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E.J.. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v.4, n.1, p.23-31, 1995.

OWOLABI M. S., OGUNDAJO A., LAJIDE L., OLADIMEJI M. O., SETZER W. N., PALAZZO M. C.. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Nigeria. **Rec. Nat. Prod.** v. 4, p. 170-177. 2009.

PASCUAL, M. E; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA SÁNCHEZ, D.; VILLAR, A.. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I.. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v.15, n 11-12, 2004.

PELCZAR, M. J. JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2ª ed. Editora Makron Books, 1996.

PEREIRA, M. A. A., **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica**. 2010. 60f. Dissertação de Mestrado, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS. 2010.

PESSOA, O. D. L; CARVALHO, C. M. B; SILVESTRE, J. O. V. L; LIMA, M. C. L; NETO, R. M; MATOS, F. J. A; LEMOS, T. L. J. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracilis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 721-714, 2005.

PINTO D. M. L., **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostha chyssetosa* (Briq.) Epling** . 2010. 81f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP-SP, 2010.

PINTO, C. M. T.. **Terpenóides em espécies do gênero *Sálvia* (Lamiaceae)**. 2012. 71f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas RS, 2012.

POZZATTI, P.; LORETO, E. S.; LOPES, P. G.; ATHAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v.53, p.12-15, 2010.

RASSOLI, I.; MIRMOSTAFA, S.A.. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2200-2205, 2003.

ROCHA, F. Â. G.; DANTAS, L. I. S.; MEDEIROS, F. G. M.; MEDEIROS, L. DE C.. *Screening* da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. In: VI CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA –CONNEPI, fev., 2011, Aracaju, Sergipe. **Paper**. Disponível em: <<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/689/405>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

ROMEO, F. V.; DE LUCA, S.; PISCOPO, A.; POIANA, M.. Antimicrobial effect of some essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.20 p. 373-379, 2008.

SANTOS, F. J. B. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia oreognoidea* HBK. **Journal of Essential Oils Research**, set/out. 2004.

SANTOS, M. R. A.; INNECCO, R.; SOARES, A. A.. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba*(Mill.) N.E. Br. em

função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 2, p. 377-383, 2004.

SANTURIO J. M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, mai-jun, 2007.

SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. de M.. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella* Enteritidis **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.30 p. 136-141, 2010.

SILVA, N. C. C.. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010.75f. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP-SP. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed.UFSC,p.821, 1999.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, v.52, p.399-403, 1989.

TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB,V.. Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**,v. 41, p.319 – 323. 2007.

TORTORA G. J.; BERDELL, R. F.; CHRISTINE, L. C..**Microbiologia**.6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E.de O.; SOUZA, E. L. de; TRAVASSOS, A. E. R.. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.29, p. 542-545, 2009.

TURGIS, M.; DANG VU, K.; DUPONT, C.; LACROIX, M.. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. **Food Research International**, v. 48, p. 696–702, 2012.

USHIMARU, P. K.; SILVA, M. T. N.; DI, S. C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 717-719, 2007.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.;MOEZELAAR, R.. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561-1568, 2002.

ULTEE, A.; GORRIS, L.G.M.; SMID, E.J.. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.211–218, 1998.

ULTEE, A.; KETS, E.P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F.A.; SMID, E. J.. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, p. 233–238, 2000.

VALGAS, C.; DANTAS, L. Í. S.; MEDEIROS, F. G. M.DE; MEDEIROS, L.DE C.. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, 2007.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L.. Levantamento de dados epidemiológicos relativos às ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**., Lavras, v. 30, n. 6, 2006.

VARDAR-UNLU, G., CANDAN, F., SOKEM, A., DAFERERA, D., POLISSIOU, M., SOKMEN, M.. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch, et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 63–67, 2003.

VICINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; COSTA, D. C. S. DA; ROMANEL, E. DA C.; SOUSA, S. M. DE; PEIXOTO, P. H. P.; SALIMENA, F. R. G.. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 171-178, 2006.

WENDAKOON, C.N.; SAKAGUCHI, M.. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, p.280– 283, 1995.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A.. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 19, n. 4, 2009.

ZIHA-ZARIFI, I.; LLANES, C.; KOHLER, T.; PECHERE, J.; PLESAT, P.. In Vivo Emergence of Multidrug-Resistant Mutants of *Pseudomonas aeruginosa* Overexpressing the Active Efflux System MexA-MexB-OprM. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, n.2,p.287-91, 1999.