

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar

VALERIANO, C.^{1*}; PICCOLI, R.H.²; CARDOSO, M.G.³; ALVES, E.⁴

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, ²Departamento de Ciência dos Alimentos, *carol_valeriano@yahoo.com.br ³Departamento de Química, ⁴Departamento de Fitopatologia, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras-Brasil *carol_valeriano@yahoo.com.br

RESUMO: Objetivou-se identificar e quantificar os constituintes e avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* contra cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii*. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada a partir de folhas secas, empregando-se a técnica de hidrodestilação e utilizando-se a aparelho de Clevenger modificado. A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi determinada pelo método de difusão em ágar. Observou-se que os óleos essenciais inibiram o crescimento bacteriano, mas a efetividade foi variada. Entre os óleos essenciais testados, *M. piperita* apresentou maior atividade antibacteriana para *E. coli* (8.106 UA mL⁻¹) quando comparada as demais bactérias, atividade moderada para *Salmonella enterica* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* (1.706 e 3.200 UA mL⁻¹ respectivamente) e baixa atividade para *Listeria monocytogenes* (106,67 UA mL⁻¹). Já óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou maior atividade antimicrobiana frente a *E. coli* (9.386 UA mL⁻¹) e atividade moderada frente a *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Listeria monocytogenes* (2.773 UA mL⁻¹ para ambas). *Ocimum basilicum* apresentou maior atividade antibacteriana frente *E. coli* e *Enterobacter sakazakii* (6.826 e 8.106 UA mL⁻¹ respectivamente), moderada atividade frente a *Salmonella enterica* Enteritidis (1.600 UA mL⁻¹) e não apresentou atividade frente a *Listeria monocytogenes*. *Origanum majorana* também foi testado neste estudo e apresentou maior atividade antimicrobiana frente *E. coli* (5.973 UA mL⁻¹), atividade moderada para *Salmonella enterica* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* (1.706 e 2.346 UA mL⁻¹, respectivamente) e não apresentou atividade para *Listeria monocytogenes*.

Palavras-chave: monoterpenos, patógenos de origem alimentar, propriedades antibacterianas

ABSTRACT: Antimicrobial activity of essential oils against sessile and planktonic pathogens of food source. The objective of this work was to identify and quantify the constituents, and to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils from *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* and *Origanum majorana*, against enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Enterobacter sakazakii*. The essential oils were obtained from dried leaves by using the hydrodistillation technique and the modified Clevenger apparatus, and their bacterial activity was determined by using the agar diffusion technique. The essential oils inhibited bacterial growth, but their effectiveness was varied. Among the essential oils tested, that from *M. piperita* showed a greater antimicrobial activity against *E. coli* (8.106 UA mL⁻¹), moderate activity for *S. enterica* Enteritidis and *E. sakazakii* (1.706 e 3.200 UA mL⁻¹ respectively) and low activity for *L. monocytogenes* (106,67 UA mL⁻¹). However, the essential oil from *C. citratus* presented a greater antimicrobial activity against *E. coli* (9.386 UA mL⁻¹) and a moderate activity against *E. sakazakii*, *S. enterica* Enteritidis and *L. monocytogenes* (2.773 UA mL⁻¹ for both). The essential oil from *O. basilicum* showed a greater antimicrobial activity against *E. coli* and *E. sakazakii* (6.826 e 8.106 UA mL⁻¹ respectively), moderate activity against *S. enterica* Enteritidis (1.600 UA mL⁻¹), and was inactive against *L. monocytogenes*. *Origanum majorana*, which was also tested in our work, showed a greater antibacterial activity against *E. coli*, (5.973 UA mL⁻¹) moderate activity against *S. enterica* Enteritidis and *E. sakazakii* (1.706 e 2.346 UA mL⁻¹, respectively), and was inactive against *L. monocytogenes*.

Key words: monoterpenes, pathogenic food source, antibacterial properties

Recebido para publicação em 25/03/2010

Aceito para publicação em 25/02/2011

INTRODUÇÃO

Patógenos de origem alimentar são amplamente diversos na natureza e continuam sendo a maior causa de problemas mundiais de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esses agentes são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade, além de resultar em custos com cuidados médicos, perda de produtividade e controle pela indústria de alimentos (Frantamico et al., 2007; Nedorostova et al., 2009). Entre os mais sérios patógenos de origem alimentar estão *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *E. coli*, os quais respondem pelo maior número de casos de doenças e mortes (Ricke et al., 2005; Oussalah et al., 2007).

Para reduzir doenças e danos econômicos causados por microrganismos patogênicos, o uso de produtos naturais como compostos antimicrobianos parece ser uma maneira interessante de controlar a presença de bactérias patogênicas e estender a vida de prateleira de alimentos processados (Cowan, 1999; Filoche et al., 2005; Nedorostova et al., 2009), principalmente devido à prevalência de microrganismos resistentes a antissépticos e antibióticos convencionais e também pelo aumento do conceito popular sobre qualidade de alimentos e do potencial impacto negativo dos aditivos sintéticos na saúde. Assim, a crescente demanda do consumidor por produtos naturais efetivos e seguros tem levado a investigações com relação aos efeitos de fitoquímicos. Entre esses estudos é crescente a pesquisa com relação aos óleos essenciais (Dorman & Deans, 2000; Draughon, 2004; Filoche et al., 2005).

Os óleos essenciais e os componentes são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes presentes em plantas; eles podem também apresentar atividade antioxidante e antiinflamatória (Cowan, 1999). Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ester, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanoides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (Bajpai et al., 2008).

Estudos da atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a patógenos de origem alimentar tem sido realizado, principalmente, *in vitro* (Oussalah et al., 2007) e, recentemente pela aplicação simultânea da bactéria e de óleos essenciais em produtos alimentícios (Solomakosa et al., 2008; Oliveira et al., 2011). Os óleos essenciais derivados de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Origanum majorana*, *Ocimum basilicum* tem sido estudados para este propósito.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* tem sido relatada contra

frente a vários patógenos (Cimanga, et al., 2002). O óleo essencial é basicamente constituído de citral (70 a 85% v/v) (Ferreira & Fonteles, 1989), mistura isomérica de neral (citral B ou isômero Z) e geranial (citral A ou isômero E) (EIFattah et al., 1992). Além destes, pode conter mirceno e outros compostos minoritário como, por exemplo, geraniol, cimbopogol, limoneno e dipenteno (Martins et. al., 2003). Óleo essencial de *Mentha piperita* tem sido também relatado por possuir atividade, antibacteriana, antiviral e antifúngica, sendo esta atividade associada principalmente aos compostos majoritários mentol, mentona, acetato de metila, iso-mentona (Singh, et al., 2011). O óleo essencial de *O. majorana* é rico em compostos bioativos como terpinen-4-ol, sabineno, acetato de linalol, γ -terpineno e linalol. Estes compostos exibem atividade antibacteriana elevada e amplo espectro de ação (Sellami, et al., 2009). Em adição o gênero *Ocimum basilicum* é conhecido por possuir uma gama de atividades biológicas, tais como repelente de insetos, inibidora de nematóides, antibacteriana, antifúngica e atividades antioxidantes (Lee et al., 2005). Compostos como, linalol, metil chavicol, cinamato de metila, metil eugenol e mistura destes são comumente os principais componentes dos óleos essenciais das espécies e variedades de *Ocimum* (Telci et al., 2006).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar e quantificar os constituintes e avaliar a atividade antibacteriana de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), manjerona (*Origanum majorana*), e manjerição (*Ocimum basilicum*) frente os patógenos de origem alimentar *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126, *Salmonella entérica* Enteritidis S 64, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004.

MATERIAL E MÉTODO

Material vegetal

Os materiais vegetais utilizados para a extração de óleo essencial foram folhas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf), manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Ocimum basilicum* L.). O material foi colhido no horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, região sul de Minas Gerais (Brasil), a 21°14' S de longitude 45°00' W GR, a 918 m de altitude. As plantas foram coletadas em novembro de 2008, na parte da manhã, em dia com temperatura amena variando entre 22 e 25°C e sem precipitação pluviométrica. O material foi herborizado segundo técnicas convencionais e identificado pela Prof^a Dr^a Mariana Esteves Mansanares do

Departamento de Ecologia da Universidade Federal de Lavras, segundo literatura taxonômica especializada. Exemplos destas espécies encontram-se registradas no herbário da Universidade Federal de Lavras sob os seguintes números: 18407 (*Mentha piperita* L.), 18409 (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf), 18408 (*Origanum majorana* L.) e 18406 (*Ocimum basilicum* L.).

Extração de óleos essenciais

O método empregado para extração dos óleos essenciais foi o de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado (Glasstec, Glasslabor). Para tal, 75g de folhas frescas de *Mentha piperita* L., *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., *Origanum majorana* L., e *Ocimum basilicum* L. foram picadas e colocadas, juntamente com água em balão volumétrico com capacidade de 1.000 mL. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger modificado e a extração foi realizada pelo período de 2,5 horas, controlando-se a temperatura a, aproximadamente, 100°C. Posteriormente, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado a 321,8 x G, por 5 minutos. O óleo essencial foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e estocado, à temperatura de refrigeração, em frascos de vidro envoltos por papel alumínio. (Guimarães et al., 2008).

Identificação e quantificação dos constituintes químicos

Análises qualitativas dos óleos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se aparelho Shimadzu CG-17^a, com detector seletivo de massa modelo QP 5050^a, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm) com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280°C; programação da coluna com temperatura inicial de 50°C, por 2 minutos com aumento de 4°C minuto⁻¹ até 200°C; depois, 10°C minuto⁻¹ até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos; gás carreador hélio (1 mL min⁻¹); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa split 1:83 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano). As condições para espectrômetro de massas (EM) foram energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição 1000, intervalo de decomposição de 0,50 e fragmentos de 40 Da e 550Da decompostos. Uma mistura linear de (C₉H₂₀; C₁₀H₂₂; C₁₁H₂₄; ... C₂₄H₅₀; C₂₅H₅₂; C₂₆H₅₄) foi injetada nas mesmas condições da amostra. Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovats, calculando para cada constituinte de acordo com Adams (2007).

A quantificação dos constituintes dos

óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa. Nesta análise, foi utilizado cromatógrafo gasoso Shimadzu CG - 17 A, com detector por ionização de chama (FID), nas condições cromatográficas de coluna capilar (DB5); programação da coluna com temperatura inicial de 50°C, por 2 minutos, com aumento de 4°C minutos⁻¹, até 200°C; depois, 10°C minutos⁻¹ até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos. Utilizou-se como gás carreador o nitrogênio (2,2 mL min⁻¹) e, ainda, taxa de split de 1:10 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

Teste da atividade antimicrobiana Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica CDC O126, *Salmonella entérica* Enteritidis S 64, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Enterobacter sakazakii* ATCC 29004, provenientes da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Padronização, estocagem e preparo do inóculo

Para a padronização do número de células, a cepa foi inicialmente inoculada em frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de meio de cultura caldo tripton de soja (TSB) (Himedia[®], Mumbai, Maharashtra, Índia), o qual foi incubado a 37°C. Em seguida, a partir do TSB, a curva de crescimento foi determinada pela realização periódica de leituras da absorbância da cultura a 600 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP 22) e de diluições seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) com posterior plaqueamento em superfície para determinação do Log UFC mL⁻¹, utilizando-se como meio de cultura ágar tripton de soja (TSA) (Himedia[®], Mumbai, Maharashtra, Índia).

Durante a realização do experimento, a cepa foi estocada sob refrigeração em meio de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol, 0,5 g de peptona bacteriológica, 0,3 g de extrato de levedura e 0,5 g de NaCl, pH 7,2±7,4). Para ativação e utilização da cepa, uma alíquota do meio de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37°C, por 24 horas, neste meio de cultura. Em seguida, a cultura foi estriada em placas contendo TSA e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, foi retirada uma alçada e transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de TSB, o qual foi incubado a 37°C, até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento.

Determinação da atividade antimicrobiana

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar, de acordo com Mendonça (2004), com modificações. Como meio de cultura utilizou-se TSA. Para o preparo das cavidades de deposição dos óleos essenciais, uma camada inicial do meio de cultura foi depositada em placas de Petri, sobre as quais, após solidificação, foram dispostas pérolas de vidro. Uma sobrecamada do meio de cultura contendo o inócuo na concentração de, aproximadamente, 8 Log UFCmL^{-1} , foi depositada sobre as pérolas de vidro dispostas na superfície da camada inicial. Após solidificação da sobrecamada, as pérolas de vidro foram removidas com o auxílio de pinças estéreis, dando origem às cavidades. Em seguida, $10 \mu\text{L}$ das diferentes concentrações (0; 0,39; 078; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50), expressas em % (v/v) dos óleos essenciais de hortelã e capim-limão, manjerona, manjerição, diluídas em etanol a 95% v/v, foram transferidas para as cavidades. A concentração 0% (v/v), constituída apenas de etanol, foi utilizada como controle positivo do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas, a 37°C , por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados com auxílio de um paquímetro. O experimento foi realizado em três repetições e os resultados foram expressos como a média dos três valores. A atividade antibacteriana foi caracterizada pelo comprometimento do crescimento bacteriano, observado pela formação de halo de inibição. A menor concentração que apresentou atividade antimicrobiana foi definida como concentração mínima inibitória (CMI).

Análise dos dados

Os dados de atividade bactericida dos óleos essenciais obtidos pelo método de difusão em placa foram padronizados em unidades arbitrárias por mL (UA mL^{-1}) de acordo com Nguetack et al. (2004), para posteriormente, serem comparados entre si. Para a obtenção das UA mL^{-1} utilizou-se a fórmula:

$$\left[\frac{\text{DH}}{\text{Fator de diluição}} \right] \times 50$$

em que DH é o diâmetro inibitório para a menor concentração (em milímetros). De posse dos valores das UA mL^{-1} , procedeu-se a análise de variância, tendo os dados de UA dos óleos essenciais para cada bactéria sido transformados em raiz de $x+0,5$ e as médias comparadas pelo teste de Scott & Knott (1974) usando o pacote "Laercio" (Silva, 2008), compilado pelo software R® (2009).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* contra as quatro espécies de bactérias testadas, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella entérica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii* está sumarizada na Tabela 1. Os resultados revelam que os óleos essenciais demonstraram atividade antimicrobiana em variadas magnitudes, sendo a maioria das bactérias testadas sensível aos óleos.

Os principais constituintes do óleo essencial de *M. piperita* identificados e quantificados foram mentol (32,33%), neoiso-mentol (28,12%), mentona (20,95%) acetato de metila (6,65%) e iso-mentona (4,82%) (Tabela 2). Prévias investigações da composição são consistentes com os resultados encontrados, segundo os quais mentol e mentona são compostos majoritários. Iscan et al. (2002) elucidaram, por GC e GC/MS, a composição e relativa porcentagem de quatro amostras de óleos essenciais de *M. piperita* de fontes distintas. Os resultados demonstraram que as amostras continham mentol (28%-42%) e mentona (18%-28%) como os principais constituintes.

Quando comparada a atividade antibacteriana do óleo essencial de *M. piperita* frente às bactérias testada, observou-se que este apresentou maior atividade para *E. coli*, seguido de atividade moderada para *Salmonella* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e baixa atividade para *Listeria monocytogenes*. Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana de *M. piperita* (Cowan, 1999; Tassou et al., 2000; McKay & Blumberg, 2006). Mentol tem sido relatado como sendo o composto responsável pela atividade antimicrobiana de *M. piperita* (Sivropoulou, 1995) e foi apresentado como ativo contra *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aerarogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus Vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, inibindo estes microrganismos em concentrações de $10 \mu\text{L}$ por placa, utilizando o método de plaqueamento em ágar (Iscan et al., 2002). Contudo, alguns estudos sugerem que mentol não parece ser o único agente responsável pela propriedade antimicrobiana de *M. piperita*. Yadegarinia et al. (2006) observaram alta atividade antimicrobiana de óleo essencial de *M. piperita* com concentrações baixas de mentol (3,6%). Assim, pode-se deduzir que outros compostos químicos presentes no óleo também contribuem para alta atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. piperita*.

Na avaliação, o óleo essencial de *C. citratus* apresentou, na constituição, 38,43% de geranial, 31,12% de neral, 4,21% de linalol e 2,53% de mirceno (Tabela 2). Geranial e neral são estereoisômeros e a mistura constitui o citral. Assim, o citral é mistura

TABELA 1. Atividade bactericida (UA mL⁻¹) dos diferentes óleos essenciais para *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii*.

Bactéria	Atividade do óleo essencial (UA mL) ¹				CV (%)
	<i>Mentha piperita</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Origanum majorana</i>	
1	1.706 ± 282,21 b C	2.773 ± 213,33 a B	1.600 ± 184,75 b B	1.706 ± 213,33 b B	10,48
2	8.106 ± 1.128 aA	9.386 ± 853,33 aA	6.826 ± 853,33 aA	5.973 ± 426,67 aA	9,79
3	106,67 ± 6,67 b D	2.773 ± 213,33 a B	0,00 ± 0,00 c C	0,00 ± 0,00 c C	10,85
4	3.200 ± 369,50 b B	2.773 ± 213,33 b B	8.106 ± 426,67 aA	2.346 ± 213,33 b B	7,05

Medias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha ou maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974) (pd⁰0,05). AU.mL⁻¹ calculado usando a seguintes formula: media do diâmetro do halo de inibição (mm) ÷ fator diluição x 50

isomérica de geranial [(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral A ou isômero E] e neral [(2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral B ou isômero Z] (El Fattah et al., 1992). Observa-se que os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. citratus* utilizado neste estudo assemelha-se aos encontrados nos trabalhos consultados. Oliveira et al. (2010) encontraram, como constituintes do óleo essencial de *C. citratus*, geranial (42,91%), neral (30,90%), linalol (1,51%) e mirceno (1,36%).

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou maior atividade antimicrobiana frente a *E. coli* quando comparada as demais bactérias e atividade moderada frente a *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*.

Doran et al. (2009) demonstraram que o óleo essencial de *C. citratus* inibiu bactérias resistentes a antibióticos em concentrações muito baixas (0,06%). Onawunmi (1984), ao avaliar a atividade de citral frente a bactérias e fungos, constatou que a mínima concentração inibitória obtida para *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *M. gypseum* foi de 0,05% (v/v), enquanto para *A. fumigatus* foi de 0,08% (v/v). Segundo este autor, 0,01% de citral levou a ligeira inibição no crescimento de *E. coli*; já em concentrações mais altas (0,03, 0,05, 0,08 e 0,1%), citral demonstrou rápida diminuição na viabilidade da contagem final de células.

Entre os óleos essenciais avaliados, apenas *C. citratus* apresentou atividade frente a *L. monocytogenes*. Esses achados estão de acordo com os de Oussalah et al. (2007), que também observaram superioridade na atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. citratus* frente a *L. monocytogenes*, tendo a CMI encontrada para o óleo essencial sido de 0,4% (v/v). Lis-Balchin & Deans (1997) observaram forte atividade antilisterial de *C. citratus* e encontraram correlação entre essa atividade e o alto conteúdo de geranial e neral. A moderada atividade registrada pelo método de difusão em Agar, neste estudo, pode ser atribuída à baixa afinidade entre componentes menos polares, como neral e

geranial e o substrato polar (ágar), o que pode diminuir atividade do óleo essencial de *C. citratus*.

Apesar de as atividades antimicrobianas e antifúngicas do óleo essencial de *C. citratus* serem atribuídas ao citral (Guerra et al., 2000), é possível que a atividade dos principais componentes seja modulada por outras moléculas que estão presentes em menor quantidade. Onawunmi et al. (1984) demonstraram sinergismo entre os componentes do óleo, observando que mirceno não apresentou atividade antimicrobiana, mas, quando associado ao citral, potencializou o efeito. É possível que a atividade dos principais componentes seja modulada por moléculas menores (Hoet et al., 2006; Bakkali et al., 2008).

Óleo essencial de *Ocimum basilicum* apresentou maior atividade antimicrobiana para *E. coli* e *Enterobacter sakazakii*; moderada atividade frente a *Salmonella Enteritidis* e não apresentou atividade frente a *Listeria monocytogenes*. Segundo Sinha & Gulati (1990), o óleo essencial de *Ocimum basilicum* de varias regiões foi efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella thyphi*, *Samonella paratyphi*, *Shigella boydii* e *Proteus vulgaris*. Deans & Ritcie (1987) ao avaliaram vários óleos essenciais (incluindo *O. basilicum*), quanto à propriedade antimicrobiana contra 25 gêneros de bactérias, utilizando a técnica de difusão em ágar, constataram que a maioria das bactérias testadas, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Brevibacterium linens*, *Brocothrix thermosphacta*, *Erwinia carotovora*, *E. coli*, *Lueconostoc cremoris*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Yersinia enterocolitica*, apresentou ampla sensibilidade ao óleo essencial de *O. basilicum*.

O óleo essencial de *O. basilicum* apresentou na constituição 59,19% de linalol, 13,74% de 1,8 cineol, 6,91% de cinamato de metila, 3,94% de á-epi-cadinole e 2,44% de metil chavicol (Tabela 2). A atividade antibacteriana pode ser, em parte, devido, à presença do alto conteúdo de linalol (Sartoratto et al., 2004; Sokovic & Griensven, 2006).

A atividade antimicrobiana dos principais constituintes do óleo essencial de *O. basilicum* (Linalol, 1,8 cineol, metil chavicol, eugenol e metil cinamato) foi também estudada. Pattnaik et al. (1997) avaliaram as propriedades antibacterianas dos constituintes aromáticos de óleos essenciais. Os resultados dos testes demonstraram que linalol foi o mais efetivo composto, inibindo 17 das 18 cepas bacterianas. Álcoois são conhecidos por possuir atividade bactericida em vez de bacteriostática contra células vegetativas. O álcool terciário linalol é ativo contra microrganismos testados, potencialmente atuando tanto como agente de desnaturação protéica ou como solvente desidratante (Suppakul et al., 2002).

Knobloch et al. (1989) avaliaram a atividade antimicrobiana dos componentes do óleo essencial de *O. basilicum* contra bactérias gram-negativas (e.g. *Enterobacter aerogenes* e *P. Vulgaris*), bactérias gram-positivas (e.g. *S. aureus* e *B. subtilis*) e fungos (e.g. *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *P. expansum*). Estes autores constataram que linalol, com alta solubilidade em água, teve significativa atividade antimicrobiana, quando comparado a outros compostos, como cinamaldeído, citral, geraniol, eugenol e mentol, ao passo que metil chavicol, com baixa solubilidade, apresentou menor atividade antimicrobiana.

A solubilidade em água dos constituintes dos óleos essenciais está diretamente relacionada à capacidade de penetrar na parede celular de fungos e bactérias. Contudo, a atividade antimicrobiana desses óleos deve-se à solubilidade na bicamada lipídica da membrana celular (Knobloch et al., 1989; Suppakul et al., 2002).

Óleo essencial de *Origanum majorana* também foi testado neste estudo e quando comparada sua atividade antibacteriana frente às bactérias, este apresentou maior atividade para *E. coli*, atividade moderada para *Salmonella* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e não apresentou atividade antibacteriana para *Listeria monocytogenes*.

Para os constituintes do óleo essencial do *O. majorana* utilizado, as proporções e as substâncias identificadas foram 38,17% de terpinen-4-ol, 7,71% de γ -terpineno, 6,50% de p-cimeno e 3,84% de α -terpineno (Tabela 2). Bussata et al. (2008), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *O. majorana* frente a dez espécies de bactérias, observaram que todos os microrganismos testados foram suscetíveis à ação do óleo essencial, com valores de MIC a partir de 0,069 a 2.3 mg mL⁻¹. Deans & Svoboda (1990), em estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo de *O. majorana* sobre 25 bactérias, mostraram um poder inibitório sobre considerável número de bactérias.

A atividade antibacteriana apresentada pelo

óleo pode ser devido à terpinen-4-ol e γ -terpineno. γ -Terpineno tem sido relatado por apresentar significativa atividade antimicrobiana (Carson & Riley, 1995; Cosentino et al., 1999) e terpinen-4-ol tem sido citado por apresentar atividade bacteriostática contra alguns microrganismos (Barel et al., 1991). Contudo, os compostos que são encontrados em menor quantidade, como p-cimeno e α -terpineol, podem também contribuir para atividade antimicrobiana dos óleos (Carson & Riley, 1995; Pattnaik et al., 1997; Cosentino et al., 1999; Tabanca et al., 2001), sendo possível que estejam envolvidos em algum tipo de sinergismo com outros compostos ativos (Marino et al., 2001; Xianfei et al., 2007).

A maior atividade de óleo essencial frente a *E. coli*, *Salmonella*, Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e a menor atividade frente a *Listeria monocytogenes* diferem da maioria dos estudos que relatam que bactérias gram-positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do que as gram-negativas (Davison, 1997). Entretanto, alguns estudos não confirmam estas observações. Burt (2004) afirma que bactérias gram-positivas têm sido menos ou igualmente sensíveis a bactérias gram-negativas. Doran et al. (2009), avaliando a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *C. citratus*, demonstraram que este óleo inibiu bactéria resistente a antibiótico a baixas concentrações (0,06%). Além disso, foi observado também que bactéria gram-positiva foi menos susceptível do que gram-negativa. Ao estudarem a atividade antimicrobiana de 22 óleos essenciais frente a 10 cepas bacterianas, Kotzekidou et al. (2008) demonstraram que *S. typhimurium* (gram-negativa) foi a cepa mais sensível, sendo inibida por 17 dos compostos testados, enquanto *L. monocytogenes* (gram-positiva) foi a cepa mais resistente, sendo inibida por somente quatro dos compostos testados.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com estas observações, uma vez que *Listeria monocytogenes* apresentou maior resistência aos óleos testados quando comparada às bactérias gram-negativas. Randrianarivelo et al. (2009), ao avaliarem amostras de óleos essenciais de *Cinnamosma fragrans* originárias de duas regiões em Madagascar, Tsaramandrosa (B8) e Mariarano (B143), frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, observaram que cepas de *Micrococcus* foram mais resistentes aos óleos B134, sendo tão resistente quanto cepas de *Salmonella* ao óleo B8.

A permeabilidade da membrana bacteriana, a presença de proteínas porinas em bactérias gram-negativas e a distribuição intracelular dos constituintes dos óleos essenciais são elementos chaves que influenciam a difusão e a ação dos óleos essenciais dentro das células, sendo, então, a variação na atividade dos óleos essenciais esperada contra

TABLE 2. Composição química dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Mentha piperita*, *O. basilicum* e *O. majorana* determinado por CG-MS.

C. citratus				
TR(min)	Compostos	IRRExp	IRRIit	GC-MS(%)
10,235	metil-5-epiten-2one	986	981	0,43
10,444	mirreno	990	990	2,53
12,608	linalol	1100	1096	4,21
20,897	borneol	1176	1165	0,24
22,966	neral	1244	1240	31,12
25,259	geraniol	1259	1249	1,33
26,192	geranial	1278	1264	38,43
27,073	2-undecanona	1295	1293	2,37
Total identificado 80.66%				
M. piperita				
TR(min)	Compostos	IRRExp	IRRIit	GC-MS(%)
6,808	artemisia triene	932	929	0,32
8,060	sabineno	971	975	0,12
8,218	β -pineno	976	979	0,37
8,616	mirreno	989	990	0,25
9,996	limoneno	1028	1029	0,94
10,109	1,8 -cineol	1032	1031	0,07
14,393	isopulegol	1149	1149	0,68
14,712	mentona	1157	1152	20,95
15,022	iso-mentona	1165	1162	4,82
15,207	mentol	1170	1171	32,33
15,688	neiso-menthol	1183	1186	28,20
17,695	pulegona	1238	1237	0,25
18,269	piperitona	1238	1252	1,38
18,890	acetate de neo-isopulegila	1271	1276	0,19
18,942	acetate neo-metila	1273	1273	0,12
19,586	acetate de metila	1290	1295	6,65
20,108	acetate de iso-metila	1305	1305	0,16
24,033	(E)-cariofileno	1419	1419	0,37
26,064	germacreno D	1481	1481	0,15
Total identificado 98.32%				
O. basilicum				
TR(min)	Compostos	IRRExp	IRRIit	GC-MS(%)
8,225	β -pineno	986	981	0,68
10,117	1,8-cineol	1031	1031	13,74
12,608	linalool	1100	1096	59,19
14,333	cânfora	1147	1146	0,86
16,125	α -terpineol	1195	1188	1,52
16,225	metil chavicol	1198	1196	2,44
19,425	acetate de isobornila	1284	1285	0,96
19,425	<i>trans</i> -anetol	1286	1284	0,90
22,850	cinamato de metila	1383	1378	6,91
23,383	metil eugenol	1399	1403	0,86
27,100	γ -cadineno	1513	1513	1,30
31,083	α -epi-cadinol	1642	1640	3,94
Total identificado 93.3%				

continua...

TABLE 2. Composição química dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Mentha piperita*, *O. basilicum* e *O. majorana* determinado por CG-MS.

...continuação

<i>O. majorana</i>				
TR(min)	Compostos	IRRexp	IRRLit	GC-MS(%)
6,592	α -tujeno	925	925	1,05
6,808	α -pineno	932	939	0,46
8,067	sabineno	972	975	3,68
8,225	β -pineno	977	979	0,34
8,617	mirreno	989	990	1,05
9,192	α -felandreno	1006	1002	0,17
9,567	α -terpineno	1017	1017	3,84
9,854	p-cimeno	1024	1024	6,50
10,008	limoneno	1029	1029	1,15
10,058	β -felandreno	1030	1029	1,11
10,117	1,8-cineol	1032	1031	0,29
11,058	γ -terpineno	1058	1059	7,71
12,033	terpinoleno	1085	1088	1,80
15,650	terpinen-4-ol	1182	1177	38,17
16,467	<i>trans</i> -dihidro carvona	1204	1200	0,13
18,117	Acetate de linalol	1250	1257	0,79
19,433	(E)-anetol	1286	1284	0,25
19,775	acetate de terpinen-4-ol	1296	1299	1,18
19,858	cavacrol	1298	1299	0,16
24,033	(E)-cariofileno	1419	1419	1,31
26,542	biciclogemacrene	1495	1500	0,19
29,275	óxido de cariofileno	1582	1583	0,12
Total identificado 71.45%				

TR = tempo de retenção (minutos); IRRexp – índice experimental; IRRLit – índice literatura

diferentes grupos de bactérias (Lambert et al., 2001; Randrianarivelo et al., 2009).

Neste estudo foi também observado que, em geral, os óleos essenciais apresentam alta atividade antimicrobiana contra *E. coli*, concordando com outros estudos. Hammer et al. (1999), usando a técnica de difusão em Agar, concluíram que *E. coli* foi mais sensível do que cepa selecionada de *S. typhimurium* para a maioria dos óleos essenciais testados (Penalver et al., 2005).

A diferença encontrada entre a composição química dos óleos essenciais deste estudo e a composição química dos óleos essenciais de alguns trabalhos já realizados pode ser atribuída ao fato de que os óleos essenciais são um grupo heterogêneo de misturas de substâncias orgânicas nas quais os constituintes e as concentrações relativas não dependem somente da espécie da planta. Entre outros fatores que influenciam a composição química, os mais importantes são a origem da planta, a parte utilizada, o estágio de desenvolvimento, as condições climáticas e de crescimento, como temperatura, solo

e fertilizantes e as condições de destilação e estocagem (Ozcan & Erkmen, 2001; Oladimeji et al., 2001). Entretanto, a maioria componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais estudados foi semelhante aos encontrados nos trabalhos consultados.

Essa diferença apresentada na constituição e concentração dos óleos essenciais influencia diretamente a atividade antimicrobiana. Assim, a diferença na atividade antimicrobiana existente entre os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, como observado entre os óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Origanum majorana* e *Ocimum basilicum*, é relacionada à concentração e à natureza dos constituintes químicos (Chang et al., 1991).

Com relação aos óleos essenciais estudados, os constituintes majoritários encontrados foram monoterpenos. A ação antimicrobiana dos monoterpenos tem sido explicada pelo efeito tóxico na estrutura e função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão,

preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana (Sikkema et al., 1994), o que resulta em expansão da membrana, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, desordenando as proteínas embebidas na membrana, inibindo a respiração e alterando o processo de transporte de íons (Trombeta et al., 2009). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento das funções, como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (Sikkema et al., 1994).

A capacidade apresentada pelos óleos essenciais em inibir o crescimento bacteriano permite que os mesmos sejam utilizados como antimicrobianos na indústria de alimentos.

AGRADECIMENTO

Os autores gostariam de agradecer CAPES, CNPq e FAPEMIG - pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIA

Adams, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

BAJPAI, V.K.; RAHMAN, A.; SUN C.K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.117-22, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.

BAREL, S.; SEGAL, R.; YASHPHE, J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, n.1/2, p.187-91, 1991.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-53, 2004.

BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.207-11, 2008.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n.3, p.264-9, 1995.

CHANG, W.C.; HSU, F.L. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thunb. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.45, n.4, p.307-12, 1991.

CIMANGA K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79 n.2, p.213-20, 2002

COSENTINO, S. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, n.2, p.130-5, 1999.

COWAN, M.M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. New York: AMS, 1997. p.520-56.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, p.165-80, 1987.

DEANS, S.G.; SVOBODA, K.P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.5, n.3, p.187-90, 1990.

DORAN, A.L. et al. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, n.4, p.387-92, 2009.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.2, p.308-16, 2000.

DRAUGHON, F.A. Use of botanicals as biopreservatives in foods. **Food Technology**, v.58, n.2, p.20-8, 2004.

EL FATTAH, M.A. et al. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofiya Journal Agriculture Research**, v.17, n.3, p.1211-30, 1992.

FERREIRA, M.S.C.; FONTELES, M.C. Aspectos entnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 70, n.4, p.94-7, 1989

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.; SISSONS, C.H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, v.20, n.4, p.221-5, 2005.

FRANTAMICO, P.M.; BHUNIA, A.K.J.; SMITH, L. Food-borne pathogens: microbiology and molecular biology. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, n.24, p.1180, 2007.

GUERRA, M.M.; BERNARDO, F.M.A. Relevância sanitária de *Listéria monocytogenes* nos produtos lácticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v.94, n.530, p.142-8, 1999.

GUIMARÃES, L.G.L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). **Química Nova, São Paulo**, v.3, n.6, p.1476-80, 2008.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.6, p.985-90, 1999.

HOET, S. et al. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, v.72, n.5, p.480-2, 2006.

ISCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.14, p.3943-6, 2002.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v.1, n.1, p.119-28, 1989.

KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical

- composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.20, p.7681-5, 2005.
- LAMBERT, R.J.W. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p.453-62, 2001.
- LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-7, 2005.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.82, n.6, p.759-62, 1997.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceae and compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.3, p.187-95, 2001.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 220p.
- MCKAY, D.; BLUMBERG, J.B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**, v.20, n.7, p.519-30, 2006.
- MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de Staphylococcus aureus em ricota cremosa**. 2004. 72p. Tese (Doutorado - Área de concentração em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Ciências dos Alimentos Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against food-borne bacteria. **Food Control**, v.20, n.2, p.57-60, 2009.
- NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, P.395-400, 2004.
- OLADIMEJI, F.A. et al. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v.11, n.2, p.64-7, 2001.
- OLIVEIRA, M.M.M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v.21, n.4, p.549-53, 2010.
- OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.3, 2011.
- ONAWUNMI, G.O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**, v.9, n.3, p.105-8, 1984.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, n.5, p.414-20, 2007.
- OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research and Technology**, v.212, n.6, p.658-60, 2001.
- PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, v.89, n.358, p.39-46, 1997.
- PENALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v.113, n.1, p.1-6, 2005.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 out. 2009.
- RANDRIANARIVELO, R. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. **Food Chemistry**, v.114, n.2, p.680-4, 2009.
- RICKE, S.C. et al. Alternatives to antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and food-borne pathogen response. **Poultry Science**, v.84, n.4, p.667-75, 2005.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.275-80, 2004.
- SCOTT, A.J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.507-12, 1974.
- SELLAMI, I.H. et al. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). **Industrial Crops and Products**, v.30, n.3, p.395-402, 2009.
- SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.8022-8, 1994.
- SILVA, L.J. **Laercio: duncan test, tukey test and scott-knott test**. R package version 1.0-0, 008. 2008. 5p.
- SINGH, R.; SHUSHNI, M.A.M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activity of *Mentha piperita* L., **Arabian Journal of Chemistry**, v.4, n.1, p.1-20, 2011
- SINHÁ, G.K.; GULATI, B.C. Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents. **Indian Perfumer**, v.34, n.2, p.126-9, 1990.
- SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T. Antimicrobial activity of mint essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.9, p.2384-8, 1995.
- SOKOVIC, M.; GRIENSVEN, L.J.L.D. van. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. **European Journal of Plant Pathology**, v.116, n.3, p.211-24, 2006.
- SOLOMAKOSA, N.; GOVARISA, A.; KOIDISB, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v.25, n.1, p.120-7, 2008.
- SUPPAKUL, P. et al. Preliminary study of antimicrobial films containing principal constituents of basil. In: **IAPRI WORLD CONFERENCE ON PACKAGING**, 13., 2002, East Lansing. **Proceeding...** East Lansing: CRC, 2002.

- TABANCA, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4300-3, 2001.
- TASSOU, C.C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G.J.E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, v.33, n.3/4, p.273-80, 2000.
- TELCI, I.; BAYRAM, E.; YÝLMAZ, G.; AVCÝ, B. Variability in essential oil composition of Turkish basil (*Ocimum basilicum* L.) **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, n.6, p.489-97, 2006.
- TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.6, p.2474-8, 2005.
- XIANFEI, X. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1312-5, 2007.
- YADEGARINIA, D. et al. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v.67, n.12, p.1249-55, 2006.