

Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos

SILVA, M.T.N.; USHIMARU, P.I.; BARBOSA, L.N.; CUNHA, M.L.R.S.; FERNANDES JUNIOR, A.*

Departamento de Microbiologia e Imunologia, IBB/UNESP – Caixa postal 510. Distrito Rubião Junior, Botucatu/SP, CEP 18610-000, (14) 3811.6058. *ary@ibb.unesp.br

RESUMO: A ação antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais de seis plantas foi verificada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM=%v/v) pela diluição dos óleos em meio de cultura Mueller Hinton Agar, frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* (n=16) e *Escherichia coli* (n=16) isoladas de casos clínicos humanos, além de 1 amostra padrão ATCC para cada espécie (Sa ATCC 25923 e Ec ATCC 25922), e determinação de curvas de sobrevivência em concentrações equivalentes a CIM_{90%} dos respectivos óleos. O óleo essencial de canela foi o mais eficiente, com valores de CIM_{90%} de 0,047 e 0,09 para *S. aureus* e *E. coli* respectivamente, enquanto gengibre (0,09), cravo da Índia (0,095) e capim cidreira (0,1) apresentaram eficiências semelhantes para *S. aureus*. Frente a *E. coli*, os óleos de gengibre (0,52) e capim cidreira (0,55) foram equivalentes quanto à eficiência. De acordo com as curvas de sobrevivência, foi possível verificar também que os valores de CIM_{90%} obtidos podem ser tanto bactericidas ou bacteriostáticas de acordo com a bactéria testada. Em conclusão, verificou-se que os óleos essenciais testados foram efetivos no controle do desenvolvimento bacteriano, sendo o potencial antimicrobiano diferente em função da espécie bacteriana testada, sendo que a bactéria Gram positiva (*S. aureus*) mostrou-se mais susceptível aos óleos testados que a Gram negativa (*E. coli*).

Palavras-chave: plantas medicinais, óleos essenciais, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, ação antibacteriana

ABSTRACT: Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. The *in vitro* antibacterial activity of essential oils from six plants was verified through minimal inhibitory concentration (MIC=%v/v), determined by diluting the oils in culture medium Mueller Hinton Agar, against *Staphylococcus aureus* (n=16) and *Escherichia coli* (n=16) strains isolated from human clinical specimens, besides one standard ATCC strain for each species (Sa 25923 and Ec 25922). Time-kill curves were also determined at concentrations equivalent to MIC_{90%} for the respective oils. Cinnamon oil was the most efficient, with MIC_{90%} values of 0.047 and 0.09 against *S. aureus* and *E. coli*, respectively, whereas ginger (0.09), cloves (0.095) and lemon grass (0.1) showed similar activities against *S. aureus*. Ginger (0.52) and lemon grass (0.55) oils were equivalent in efficiency against *E. coli* strains. According to the time-kill curves, the obtained MIC_{90%} values could indicate either bactericidal or bacteriostatic effects depending on the tested bacterium. Thus, the studied essential oils were effective to control bacterial development, the antimicrobial potential differed with the tested bacterial species, and Gram-positive bacteria (*S. aureus*) strains were more susceptible to the tested oils than Gram-negative ones (*E. coli*).

Key words: medicinal plants, essential oils, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, antibacterial activity

INTRODUÇÃO

Uma planta é medicinal quando possui substâncias ativas que provocam no organismo humano reações que podem variar da cura ao abrandamento da doença (Silva Júnior, 1994), e no

Brasil, o uso das plantas com finalidade terapêutica vem crescendo exponencialmente (Nascimento et al., 2000). Por outro lado, inúmeros pesquisadores salientam a necessidade de uso moderado objetivando

evitar problemas quanto ao uso prolongado e indiscriminado destes produtos (Marinho et al., 2007; Negrelle et al., 2007).

Óleos essenciais são produtos voláteis presentes em vários órgãos vegetais (partes aéreas, cascas, troncos, raízes, frutos, flores, sementes e resinas) e estão relacionados ao metabolismo secundário das plantas exercendo diversas funções importantes à sobrevivência vegetal, como por exemplo na defesa contra microrganismos (Lima et al., 2006). A composição química depende de vários fatores, sendo como exemplos os climáticos, ação de predadores, idade da planta, etc. (Gobbo Neto & Lopes, 2007). A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão (Bertini et al., 2005). Eles apresentam ação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Dorman & Deans, 2000; Alvarenga et al., 2007; Ushimaru et al., 2007) e ainda sobre leveduras (Hammer et al., 1999) e fungos filamentosos (Souza et al., 2004; Viegas et al., 2005).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L. - Lamiaceae) é planta utilizada no tratamento de afecções hepática, intestinal, renal e respiratória. O óleo essencial apresenta vários compostos, incluindo diterpenos fenólicos, carnosol e ácido carnosico, ácido rosmarínico e flavonóides (Sá et al., 2006).

O óleo essencial de cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L. - Myrtaceae) está presente na planta em grande quantidade, entre 15 e 25% e é utilizado na culinária, nas indústrias de alimento e também na medicina. O principal constituinte deste óleo é o ácido cinâmico (70 a 80%) e eugenol (4 a 7%) (Matan et al., 2006) e a ação antimicrobiana é relatada frente a inúmeros microrganismos (Dorman & Deans, 2000).

O uso do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe - Zingiberaceae) é bem conhecido na culinária como tempero, mas há muito tempo os chineses já o utilizavam também na medicina. É geralmente utilizado no tratamento de disenteria, malária, reumatismo e resfriados e o óleo é composto por uma diversidade de terpenos (Sabulal et al., 2006).

O óleo essencial de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf - Poaceae] é composto de mirênio, neral, gerônio e outros compostos e é utilizado na medicina popular para o tratamento de resfriados, disenteria, dores de cabeça, tranqüilizante e antiespasmódico (Pereira et al., 2004). Relatos sobre ação antimicrobiana de óleos essenciais de *C. citratus* são freqüentes (Nguefack et al., 2004).

Embora seja planta nativa da região do Mediterrâneo, a hortelã pimenta (*Mentha piperita* L. - Lamiaceae) é cultivada em todos os lugares do mundo e utilizada na culinária, nas indústrias de

alimentos e perfumes, na agricultura e na medicina. O óleo essencial é um dos mais produzidos e consumidos (Iskan et al., 2002), composto por mentofurano, mentol, acetato de metila, mentona, 1,8 cineol, pulegona, α -limoneno, β -pineno, isomentol, α -pineo e mircenol (David et al., 2006).

O óleo essencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume - Lauraceae) é utilizado como flavorizante, aromatizante e conservante natural de alimentos. Estudos mostraram a capacidade de inibir o crescimento de fungos (Lima et al., 2006) e de bactérias (Matan et al., 2006). Foram identificados 23 constituintes no óleo essencial obtido de folhas de canela, sendo o eugenol o composto que apresentou maior percentual (60%). A partir de galhos foram identificados 36 compostos com predominância de monoterpenos α e β -pineno, α -felandreno, ρ -cimeno, limoneno, linalol, sequiterpenos α -copaeno, β -cariofileno, óxido de cariofileno e os alilbenzenos ϵ -cinamaldeído e aceto de ϵ -cinamila (Lima et al., 2005).

Este estudo teve como objetivo determinar a ação antibacteriana de seis óleos essenciais de acordo com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e determinação de curvas de sobrevivência, para linhagens das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos.

MATERIAL E MÉTODO

Plantas e obtenção dos respectivos óleos

Foram testados os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cravo da Índia (*Caryophyllus aromaticus* L.), gengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe), capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf], hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.) e canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). Os óleos de cravo da Índia, gengibre e capim cidreira, foram preparados através da extração pelo arraste em vapor d'água em equipamento da marca Marconi modelo MA480 no Departamento de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP/Campus de Botucatu/SP, sendo as matérias primas obtidas no mercado local da cidade de Botucatu/SP. Os demais óleos essenciais (canela, alecrim e hortelã pimenta) foram obtidos na forma pronta, sendo estes obtidos junto a Bioessência Produtos Naturais Ltda—Barra Bonita/SP, empresa no ramo deste tipo de produtos, sendo estes óleos também produzidos pela metodologia de arraste pelo vapor d'água. De todas as plantas testadas, apenas o *C. citratus* foi possível obtenção de exsiccata, que recebeu número BTU24297, no Herbário do Departamento de Botânica do IBB/UNESP/Campus de Botucatu/SP.

Linhagens bacterianas testadas

Foram utilizadas 15 linhagens de *S. aureus*

e 15 de *E. coli* isoladas de materiais clínicos humanos diversos de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP/Campus de Botucatu, e mantidas em meio de Agar Nutriente no Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP/Botucatu. Além das linhagens isoladas de casos clínicos, foram utilizados nos ensaios linhagem padrão ATCC (American Type Culture Collection) de *S. aureus* (25923) e *E. coli* (25922), totalizando desta forma 16 linhagens para cada espécie estudada.

Testes de sensibilidade

Foram utilizados dois modelos de testes de sensibilidade bacteriana aos respectivos óleos, sendo um baseado na diluição dos óleos essenciais em agar para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004) e outro para a verificação do crescimento bacteriano na presença de óleos essenciais em função do tempo e determinação da curva de sobrevivência (Sforzin et al., 2000). Foram preparadas placas de Petri com concentrações de 0,025% a 3,0% v/v dos óleos diluídos diretamente em meio Mueller-Hinton Agar (MHA), adicionado de 0,2% de Tween 80 e placas controles contendo apenas MHA e 0,2% de Tween 80.

As linhagens bacterianas, inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI) a 35°C/18 horas, foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland em solução fisiológica estéril seguida de diluição 1:20, obtendo valores de 10^5 e 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL⁻¹ e em seguida semeadas nas placas contendo os óleos essenciais com auxílio de multiinoculador de Sterr com capacidade para 32 amostras simultâneas, sendo 16 *S. aureus* e 16 *E. coli*. Após incubação a 35°C por 24 horas, os valores de CIM foram considerados aqueles que não eram observadas formação de colônias e na sequência foram calculados os respectivos valores de CIM_{50%} e a CIM_{90%}. A curva de sobrevivência foi obtida utilizando uma das linhagens isoladas de casos clínicos para as duas espécies bacterianas frente aos valores da CIM_{90%} obtidos previamente. Foram preparados tubos contendo concentrações dos óleos em meio de cultura BHI acrescido de Tween 80 a 0,2% e

inoculados com 10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹. Nos tempos 0, 1, 3, 6, 9 e 24 horas de incubação a 35°C foram tomadas alíquotas dos cultivos e realizada semeadura em profundidade (método Pour Plate) em MHA, que após incubação (35°C/18-24 horas) foram realizadas contagens para obtenção dos valores de UFC mL⁻¹ e respectivos logaritmos.

Análise Estatística

Na análise estatística dos ensaios foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (Análise de Variância não-paramétrica) visando comparar os valores de CIM sendo considerada diferença significativa quando $p < 0,05$. Não foi aplicado teste estatístico para os ensaios de curva de sobrevivência.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os valores de CIM_{50%} e CIM_{90%} (%v/v) para as espécies bacterianas (*S. aureus* e *E. coli*) são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Conforme análise estatística, considerando os valores de CIM para as linhagens bacterianas estudadas, verifica-se que potencial inibidor decrescente dos óleos foi: canela = gengibre > capim cidreira = cravo da índia > hortelã pimenta > alecrim para *S. aureus* e canela = cravo da índia > gengibre > capim cidreira > hortelã pimenta > alecrim para as linhagens de *E. coli*.

Os óleos essenciais testados apresentaram semelhanças quanto ao potencial inibidor frente às espécies bacterianas estudadas com valores extremamente baixos de CIM_{90%}. Quando comparados entre si, verifica-se que o óleo essencial de canela foi o de maior eficiência sobre as linhagens de *S. aureus* (0,047%v/v) e *E. coli* (0,09 %v/v), com os menores valores de CIM. Segundo Matan et al. (2006), os compostos ativos presentes no óleo da canela, entre 50 a 60% de cinnamaldeídos e 4 a 7% de eugenol, apresentam a capacidade de interferir com síntese de algumas enzimas nas bactérias além de provocarem danos a estrutura da parede bacteriana. Também verificou-se que os óleos essenciais de canela e cravo da índia não apresentaram diferenças significativas quanto ao potencial inibidor sobre linhagens de *E. coli*. Desta forma, embora não tenha sido feita análise fotoquímica dos óleos estudados,

TABELA 1. Valores de CIM_{50%} e CIM_{90%} (%v/v) e amplitude da CIM calculados para um total de 16 linhagens de *S. aureus* (15 isolados de materiais clínicos humanos e 1 linhagem padrão ATCC 25923).

Parâmetros	alecrim ^(d)	cravo da índia ^(b)	gengibre ^(a)	capim cidreira ^(b)	hortelã pimenta ^(c)
CIM _{50%}	0,40	0,073	0,04	0,1	0,19
CIM _{90%}	0,55	0,095	0,09	0,1	0,28
Amplitude	0,3 - 0,6	0,05 - 0,1	0,025 - 0,1	0,1 - 0,1	0,1 - 0,3

Óleos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente quanto à ação inibidora do crescimento bacteriano ($p < 0,05$).

TABELA 2. Valores de CIM_{50%} e CIM_{90%} (%v/v) e amplitude da CIM calculados para um total de 16 linhagens de *E. coli* (15 isolados de materiais clínicos humanos e 1 linhagem padrão ATCC 25922).

Parâmetros	alecrim ^(e)	cravo da índia ^(a)	gingibre ^(b)	capim cidreira ^(c)	hortelã pimenta ^(d)	canela ^(a)
CIM _{50%}	>3,0	0,25	0,24	0,40	0,63	0,06
CIM _{90%}	>3,0	0,089	0,52	0,55	1,24	0,09
Amplitude	3,0 - > 3,0	0,05 - 0,3	0,05 - 0,6	0,05 - 0,6	0,05 - 3,0	0,025 - 0,1

Óleos seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente quanto à ação inibidora do crescimento bacteriano ($p < 0,05$).

possivelmente a presença de compostos ativos nos óleos estudados foi decisiva para a maior atividade antibacteriana dos óleos de canela e cravo da Índia.

O *S. aureus* apresentou maior susceptibilidade frente à ação dos óleos, enquanto concentrações maiores foram necessárias para inibir o crescimento de *E. coli*. Isto pode ser confirmado quando comparados os valores de CIM obtidos para óleo de alecrim, que foi extremamente baixo para *S. aureus*, entre 0,3 e 0,6%v/v, e extremamente elevada para *E. coli*, inclusive ultrapassado o valor de 3,0%v/v que foi o maior utilizado no estudo. Resultados semelhantes foram relatados por outros autores (Iskan et al., 2002; Nguefack et al., 2004). Uma explicação possível para as diferenças observadas quanto a sensibilidade bacteriana aos óleos pode ser a existência de diferenças na estrutura da parede bacteriana, como por exemplo a presença de lipopolissacarídeo nas bactérias Gram negativas e ausência nas Gram positivas, que permite ou não a entrada de substâncias na bactéria. Além disto, alguns óleos essenciais podem conter substâncias que penetram mais facilmente por essa camada lipídica (Bertini et al., 2005), interferindo assim na ação sobre o microrganismo.

Um aspecto importante a ser discutido sobre estudos de ação antimicrobiana de produtos naturais é o tipo de metodologia utilizada. Alguns autores utilizam o método de difusão em disco para analisar a atividade antimicrobiana (Viegas et al., 2005; Bertini et al., 2005) enquanto outros utilizam a diluição (Sforcin et al., 2000; Ushimaru et al., 2007). Nguefack et al. (2004) relatam maior atividade antibacteriana do óleo de *C. citratus* quando comparado a *Z. officinales* utilizando a metodologia da difusão. Neste estudo, no qual foi utilizada metodologia da diluição, é verificado resultado oposto, pois a maior ação inibidora foi apresentada pelo óleo essencial do gengibre quando comparado ao capim limão para ambas as espécies bacterianas testadas.

As diferenças entre os resultados obtidos e os relatados na literatura consultada evidenciam as dificuldades de comparação com estudos anteriores principalmente quanto aos parâmetros adotados nos respectivos estudos. Além disto, diferenças entre resultados podem ocorrer mesmo quando a metodologia utilizada é idêntica, pois existem também

diferenças quanto à sensibilidade de linhagens diferentes de um determinado microrganismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal.

Outro aspecto que também deve ser considerado é que os óleos apresentam características hidrofóbicas que não possibilitam mistura homogênea com o meio de cultura, podendo ocasionar diferenças no crescimento microbiano devido a exposição diferencial da bactéria ao agente inibidor. Estes, e outros parâmetros, são importantes para explicar as diferenças significativas nos valores de CIM obtidos em estudos *in vitro* (Hammer et al., 1999).

Nos ensaios para determinação de curva de sobrevivência *S. aureus* e *E. coli* são apresentados os valores de log de UFC mL⁻¹ para as linhagens em função dos óleos estudados (Figuras 1 e 2). De acordo com a variação da contagem em função do tempo dos ensaios, é possível evidenciar o efeito inibidor dos respectivos óleos nas concentrações utilizadas, sendo este efeito bactericida quando a contagem chega a zero em função do tempo, ou bacteriostático quando a contagem se mantém aproximadamente constante em função do tempo.

Para a linhagem de *S. aureus*, os óleos de gengibre, capim cidreira, hortelã pimenta e alecrim apresentaram efeito bactericida, verificado pela redução em 100% ao final de 24 horas de incubação na contagem de células viáveis, enquanto o óleo de cravo da Índia reduziu a contagem para 1% em relação ao inóculo inicial no mesmo período de tempo. O óleo de canela não apresentou eficiência considerável na redução da contagem de células viáveis, o que caracterizou efeito bacteriostático, quando comparado ao teste controle. Tal observação é importante ser destacada quanto ao óleo de canela, que embora tenha apresentado o menor valor de CIM_{90%} (0,047%v/v), esta foi considerada concentração bacteriostática do óleo em questão.

Quanto a *E. coli*, os óleos de cravo da Índia, capim cidreira e canela foram capazes de zerar a contagem ao final de 24 horas de experimentação, caracterizando assim o efeito também bactericida destes óleos. Os demais óleos (gingibre, hortelã pimenta e alecrim) apresentaram reduções iniciais consideráveis seguido de recuperação do crescimento microbiano atingindo valores próximos dos valores de UFC mL⁻¹ do ensaio controle necessário para a

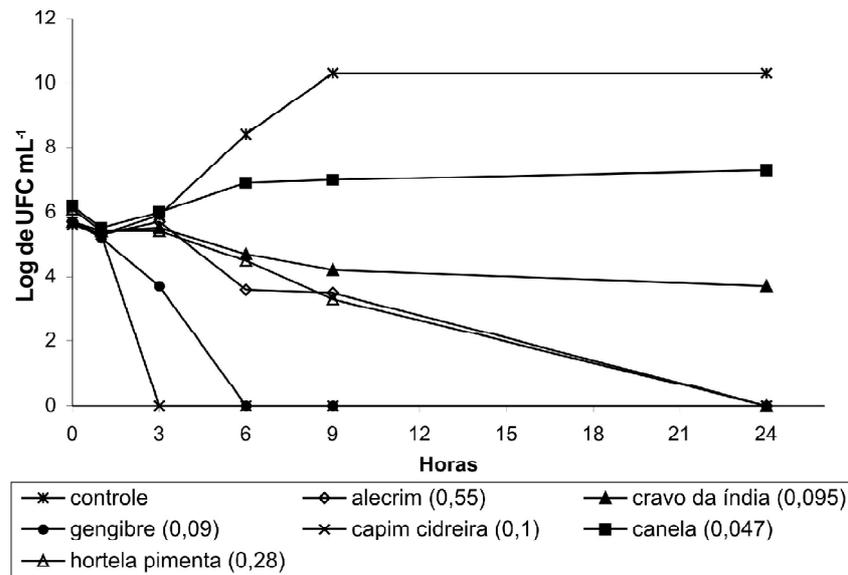


FIGURA 1. Log de UFC mL⁻¹ obtidos para a linhagem de *S. aureus* testada nas concentrações correspondentes aos valores de CIM_{90%} (%v/v) dos respectivos óleos essenciais em função do tempo

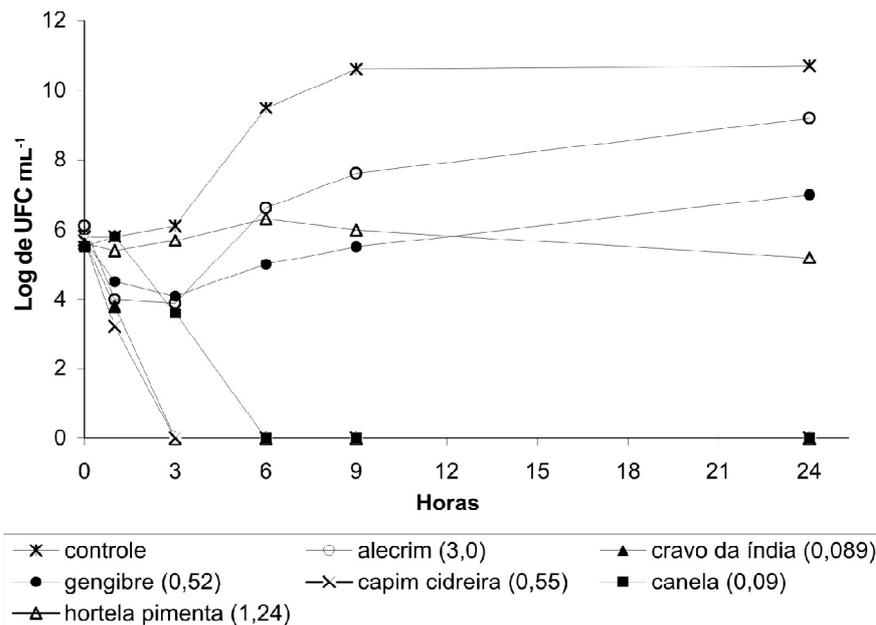


FIGURA 2. Log de UFC mL⁻¹ obtidos para uma linhagem de *E. coli* testada nas concentrações correspondentes aos valores de CIM_{90%} (%v/v) dos respectivos óleos essenciais em função do tempo

verificação do perfil de crescimento normal do microrganismo em estudo. Sobre este aspecto é possível inferir que embora exista um efeito inibidor inicial importante sobre a fisiologia da bactéria, a possibilidade de volatilização dos componentes destes óleos, ou outro evento como por exemplo interações destes componentes com matéria orgânica do meio de cultura, podem interferir com o potencial

antimicrobiano dos óleos essenciais.

Desta forma, ficou estabelecido que a ação antibacteriana dos óleos essenciais varia significativamente em função da bactéria, sendo a sensibilidade maior da bactéria Gram positiva em relação a Gram negativa. Além disto, os resultados *in vitro* sugerem o uso potencial destes óleos na terapêutica de doenças infecciosas, mais com o

indicativo de que estudos deverão ainda ser realizados objetivando testar a inocuidade destes produtos naturais bem como a necessidade de verificar as possibilidades de interferências destes óleos sobre a fisiologia e/ou estruturas das células bacterianas.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística do IBB/UNESP/Botucatu pela realização da análise estatística.

REFERÊNCIA

- ALVARENGA, A.L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.4, p.86-91, 2007.
- BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v.17, n.314, p.80-3, 2005.
- DAVID, E.F.S.; BOARO, C.S.F.; MARQUES, M.O.M. Rendimento e composição do óleo essencial de *Mentha piperita* L., cultivada em solução nutritiva com diferentes níveis de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.183-8, 2006.
- 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.
- GOBBO NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.
- 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.
- ISCAN, G.K. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.14, p.3943-6, 2002.
- LIMA, M.P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauracea). **Acta Amazônica**, v.35, n.3, p.363-6, 2005.
- LIMA, I.O. et al. Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.
- MARINHO, M.L. et al. A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.64-9, 2007.
- MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n.2, p.180-5, 2006.
- NASCIMENTO, G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p.247-56, 2000.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically: Approved Standard M7.A6**. 7.ed. Pennsylvania: Wayne, 2004.
- NEGRELLE, R.R.B. et al. Estudo etnobotânico junto a Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.6-22, 2007.
- 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, n.5, p.395-400, 2004.
- PEREIRA, R.S. et al. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004.
- SÁ, R.C.S. et al. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male wistar rats' organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.324-32, 2006.
- SABULAL, B. et al. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.67, n.22, p.2469-73, 2006.
- SFORCIN, J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.243-9, 2000.
- SILVA JUNIOR, A.A. et al. **Plantas medicinais, caracterização e cultivo**. Florianópolis: EPAGRI, 1994. 71p.
- SOUZA, S.M.C. et al. Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. **Ciência Agrotécnica**, v.28, n.3, p.685-90, 2004.
- USHIMARU, P.I. et al. Antibacterial activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.717-9, 2007.
- VIEGAS, E.C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Revista Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.915-9, 2005.