

Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

MILLEZI A.F.¹; BAPTISTA N.N.²; CAIXETA D.S.³; ROSSONI D.F.⁴; CARDOSO M.G.⁵; PICCOLI R.H.²

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Setor de Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, Brasil, amillezi@yahoo.com.br; ² Departamento de Ciência dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras - 37200-000, Lavras, Brasil; ³ Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – Universidade Federal de Mato Grosso – 78060-900; ⁴ Departamento de Ciências Exatas - Universidade Federal de Lavras - 37200-000, Lavras, Brasil; ⁵ Departamento de Química - Universidade Federal de Lavras - 37200-000, Lavras, Brasil

RESUMO: Os óleos essenciais são metabólitos secundários dos vegetais com propriedades biológicas diferenciadas, dentre elas, a atividade contra microrganismos, sendo de interesse da indústria de alimentos as concentrações mínimas inibitórias (CMI) desses óleos para diversas bactérias. As CMI variam em função dos compostos majoritários e da espécie de bactéria. Nesta pesquisa, os óleos essenciais das plantas *Satureja montana* L., *Cymbopogon nardus* L. e *Citrus limonia* Osbeck foram caracterizados quimicamente e se determinou a CMI sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A CMI dos óleos testados contra *E. coli* e *S. aureus* foi de 1,5%, exceto para o óleo essencial de *S. montana* sobre *S. aureus*, a qual foi sensível a este óleo a partir da concentração de 5,0%. Sobre a constituição química, os componentes majoritários dos óleos de *S. montana*, *C. nardus* e *C. limonia* Osbeck foram respectivamente o timol, citronelal e limoneno.

Palavras-chave: antimicrobianos naturais, bactérias, óleos essenciais

ABSTRACT: Chemical characterization and antibacterial activity of essential oils from medicinal and condiment plants against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Essential oils are plant secondary metabolites with different biological properties, such as activity against microorganisms, being of major interest to the food industry. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of these oils for various bacteria should be determined. The MIC varies according to the oil used by the major compounds and phenotypic and genotypic characteristics of the bacteria. In this research, the essential oils of the plants *Satureja montana* L., *Cymbopogon nardus* L. and *Citrus limonia* Osbeck were chemically characterized and the MIC of the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 and *Escherichia coli* ATCC 25922, determined. The MIC for all oils against *E. coli* was 1.5%, and *S. aureus* was sensitive to the concentration of 5.0% of *S. montana* oil and to the concentration of 1.5% of the essential oils of the other plants. Chemically, the major components of the *S. montana*, *C. nardus* and *C. limonia* Osbeck oils were respectively thymol, citronellal and limonene.

Keywords: natural antimicrobial agents, bacteria, essential oils

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são definidos como substâncias complexas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário de vegetais. Estes podem ser aplicados em vários segmentos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros, bem como nos setores de higiene pessoal, perfumaria, cosmética, com um mercado mundial girando em torno de US\$ 1,8 bilhão. A participação do Brasil corresponde a apenas 0,1% deste valor sendo 80% referente ao

comércio de óleo de laranja (Simões & Spitzer, 2004; Costa, 2008).

As propriedades antimicrobianas dos OEs de plantas condimentares e medicinais têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem alternativa frente à utilização de aditivos químicos em alimentos. Nos últimos anos tem sido relatado que alguns OEs são capazes de inibir bactérias de origem alimentar e prolongar a vida de prateleira de alimentos processados (Kim et al., 1995; Smith-Palmer et al., 1998). Atualmente

várias pesquisas têm investigado OEs como antimicrobianos contra diversas bactérias. Os estudos também enfocam a constituição dessas substâncias relatando a existência de diferenças na composição química entre os óleos extraídos de espécies distintas ou variedades. A composição e, conseqüentemente a atividade antimicrobiana, é influenciada por variações em função de fatores tais como: propriedades geneticamente determinadas, idade da planta, sazonalidade, disponibilidade hídrica, temperatura do ambiente onde a planta se desenvolveu, nutrientes disponíveis no solo, altitude e radiação UV (Martins et al., 2003; Gobbo-Neto & Lopez, 2007). Além disso, muitas vezes, os constituintes ativos dos OEs encontram-se em pequenas concentrações ou sua efetividade ocorre por ação sinérgica com vários outros compostos, dificultando os processos de purificação, ou a obtenção dos diferentes compostos puros.

Cymbopogon nardus, popularmente conhecido como capim-citronela é uma importante planta aromática utilizada em soluções repelentes contra insetos e no setor de perfumaria. (Castro & Ramos, 2003). O óleo essencial extraído de folhas de desse vegetal tem como compostos majoritários: citronelal, citronelol e geraniol (Oliveira et al., 2010; Andrade, 1996), sendo bastante utilizado como calmante e no combate a disfunções digestivas (Craveiro et al., 1981; Castro & Ramos, 2003).

Satureja montana comumente conhecida como segurelha de inverno ou segurelha montanhesa é erva com forte aroma e tem sido usada a centenas de anos como condimento de alimentos e chás, e na comida mediterrânea, principalmente como tempero de carnes e peixes (Prieto et al., 2007; Silva et al., 2009). Na medicina tradicional e homeopática a segurelha de inverno é utilizada em várias enfermidades, principalmente digestiva, como cólica e diarreia, estimulante, espectorante, carminativa, anticatarral, e afrodisíaco (Četkovič et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Os compostos aromáticos, variando entre carvacrol, cimeno e timol, constituem a maioria dos constituintes do óleo essencial de *Satureja montana* (segurelha) (Cávar et al., 2008; Fraternali et al., 2007; Oliveira et al., 2011).

Citrus limonia Osbeck, conhecido popularmente como limão-cravo ou limão rosa, é produzido em larga escala no Brasil. As folhas de *C. limonia* são utilizadas para infusões no combate de resfriados e coriza, além disso, o suco é utilizado na medicina alternativa para tratamento de problemas gastrointestinais e contra infecções bacterianas (Spethmann, 2004). Na constituição do OE de *C. limonia* o limoneno é o composto majoritário (aproximadamente 95%) (Fisher & Phillips, 2006).

Dentre as bactérias contaminantes de

alimentos e relatadas como agentes causadores de doenças veiculadas por alimentos, pode-se mencionar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria *S. aureus* é responsável por causar surtos de toxiose, sendo que o principal habitat em humanos e animais é a mucosa nasofaríngea, onde forma parte da microbiota normal (Fueyo et al., 2005). *E. coli* é agente causador de gastroenterites, a contaminação se dá principalmente por contato com material fecal ou contato com superfícies contaminadas (Nascimento & Stamford, 2000). Ambos os microrganismos são responsáveis por inúmeros casos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *S. montana*, *C. nardus* e *C. limonia* determinando a concentração mínima inibitória (CMI) sobre *S. aureus* e *E. coli*.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi realizada a extração e caracterização dos óleos essenciais de *S. Montana* L., *C. nardus* L. e *C. limonia* Osbeck, na segunda, foi determinada a atividade antibacteriana dos óleos essenciais.

Microrganismos utilizados e padronização do inóculo

As bactérias utilizadas no experimento foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento, relacionando-se absorvância a 600 nm e UFC mL⁻¹. Utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície em meio de cultivo Agar Triptona de Soja (TSA) e o cultivo do microrganismo em caldo-infusão de cérebro e coração (BHI). As leituras de absorvância foram realizadas periodicamente, até obterem-se 10⁸UFC mL⁻¹.

Material vegetal

Foram utilizadas folhas de *C. nardus*, obtidas no Horto de Plantas Medicinais de UFLA. As coletas foram realizadas das 8 às 9 horas da manhã, em dias ensolarados e ausentes de chuva, no mês de março de 2010, sob temperatura de, aproximadamente, 20°C (Martins et al., 1994). As folhas secas de *S. montana* foram adquiridas no Mercado municipal de São Paulo - SP e as cascas de frutos de *C. limonia* foram coletadas das 8 às 9 horas da manhã, em dias ensolarados e ausentes de chuva, no mês de março de 2010 no pomar da UFLA. As folhas de *C. nardus* e cascas de *C. limonia*, ambas coletadas frescas, foram secas em estufa

por 72 horas a 40 °C para posterior extração dos óleos essenciais.

Extração e determinação do rendimento dos OEs

O processo de extração dos OEs foi realizado empregando-se o método de hidroddestilação, em aparelho de Clevenger modificado. Foram utilizadas 300 g da amostra (*S. montana*), 200 g (*C. citratus*) e 200 g (*C. limonia*). Após 2 horas de extração, o óleo obtido foi coletado e centrifugado, a 321,8 x G, por 5 minutos, em centrífuga Fanem-Baby I Mod 206, e acondicionado em frasco de vidro revestido com papel alumínio, previamente esterilizado (Guimarães et al., 2008). A extração foi realizada em duplicata.

Foi realizada a pesagem dos frascos utilizados para acondicionar os óleos essenciais antes e após a adição dos mesmos, objetivando-se obter a massa extraída em gramas. A partir da massa obtida para extração e da umidade do material vegetal, realizados, ambos, em três repetições, os rendimentos dos óleos essenciais extraídos foram calculados e expressos em base livre de umidade (% v/p BLU).

Determinação da umidade

Para a determinação da umidade do material vegetal, 5 g de folhas frescas de *S. montana* e *C. nardus* e 5 g de cascas de *C. limonia*, separadamente, foram imersas em 80 mL de ciclohexano em balão volumétrico com capacidade de 250 mL que foi acoplado ao condensador com coletor volumetricamente graduado. A temperatura de aquecimento do balão foi de 100 °C em manta aquecedora. Após 2,5 horas, o volume de água presente nas folhas foi quantificado. A umidade foi calculada a partir do teor de água contido em 300 g da amostra (*S. montana*), 200 g (*C. citratus*) e 200 g (*C. limonia*) (Pimentel et al., 2006).

Quantificação dos constituintes dos OEs

A avaliação qualitativa dos OE foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), utilizando o aparelho Shimadzu modelo GCMS - QP2010 Plus. As condições operacionais foram: coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB5 (30m X 0,25 mm), o gás carreador utilizado foi o hélio com vazão de 1mL/min, temperaturas de 220°C no injetor e 240°C no detector, programação da coluna: temperatura inicial 40°C com acréscimo de 3°C a cada minuto. Os compostos foram identificados por comparações com espectros existentes na biblioteca (Wiley 8 e FFNSC 1.2) e pelo índice Kovat's (Adams, 2007).

Determinação da concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória dos OEs foi determinada através da técnica de Disco-Difusão conforme NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com modificações. Adicionou-se uma alíquota da suspensão padronizada dos microrganismos ao meio de cultura TSA, à temperatura de aproximadamente 45°C, obtendo-se concentração final de 10⁸ UFC mL⁻¹. A mistura foi homogeneizada e vertida imediatamente em placas de Petri sendo que a CMI foi determinada separadamente para cada bactéria em estudo. Os OEs foram diluídos em dimetilsufóxido (DMSO 0,2%) nas concentrações 0,0 (controle), 1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0 e 50,0%. Foram utilizados 5 µL de óleo essencial para a aplicação em discos de papel filtro (nº 103) medindo 6 mm de diâmetro. Os discos foram colocados sob as placas com meio de cultura TSA contendo os microrganismos. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. O controle negativo foi preparado usando somente o solvente (DMSO 0,2%). A CMI foi avaliada utilizando paquímetro para a medição dos halos de inibição.

RESULTADO E DISCUSSÃO

No Brasil há várias pesquisas que relatam a existência de diferentes características químicas entre os óleos essenciais de espécies distintas e até mesmo entre espécies iguais, porém cultivadas em diferentes regiões geográficas do globo terrestre. Nas condições utilizadas nesse estudo para extração dos óleos essenciais de *C. nardus*, *S. montana* e *C. limonia*, além da caracterização química, observou-se as variações no rendimento e umidade. O teor de umidade das folhas secas de *C. nardus* e de *S. Montana* foi de 9,0% e 8,0%, respectivamente. Para *C. limonia* obteve-se 7%, enquanto que o rendimento dos óleos foi 1,24%, 1,48% e 1,85%, respectivamente.

Resultados distintos dos obtidos no presente estudo, em relação ao rendimento dos OEs foram encontrados em outros estudos. Marco et al. (2007) examinaram o rendimento do óleo essencial de *C. nardus* cultivados em diferentes espaçamentos, altura e épocas de cortes, encontraram resultados variando de 3,52% a 4,18% de OE na matéria seca. O rendimento de óleo essencial de *S. montana* foi bastante satisfatório (1,25%), quando comparado a 0,47% ao obtido por Oliveira et al. (2011). Segundo Burt (2004), variações no rendimento do OE entre plantas pertencentes à mesma espécie podem ser atribuídas, principalmente, a diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar.

A composição química também pode variar em função de diversos fatores, entre eles as características ambientais e genéticas do

espécime. Os compostos majoritários identificados no OE de *S. montana* L. foram timol (15,47%), p-cimeno (11,5%) e carvacrol (9,81%). Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira et al (2011) para o óleo de *S. montana*: timol (28,99%), p-cimeno (12,0%) e carvacrol (10,71%). Para *C. nardus*, foram identificados os monoterpenos citronelal (30,48%), citronelol (14,32%) e geraniol (17,12%). Os resultados encontrados por Oliveira et al. (2010) foram: citronelal (34,60%), geraniol (23,17%) e citronelol (12,9%). *C. limonia* apresentou limoneno (33,67%) em maior proporção, seguido pelo p-cimeno (14,16%). Em óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus*, o limoneno pode atingir 80% da composição total (Ladaniya, 2008). Alguns fatores como as características genéticas, a idade da planta e o ambiente, podem ser determinantes na quantidade dos constituintes (Natta et al., 2008). Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), a época em que a planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas, também, as proporções relativas dos componentes da mistura. Tavares et al. (2005) analisaram a composição do OE de três quimiótipos de *Lippia alba* e encontraram variação qualitativa e quantitativa entre os constituintes químicos.

No presente estudo verificou-se que houve atividade antimicrobiana dos OEs extraídos sobre ambas as bactérias. Na Tabela 1 podem-se observar os valores de halos inibitórios para cada bactéria e OE.

Staphylococcus aureus teve maior sensibilidade ao OE de *C. limonia*. A partir da concentração de 10% esse óleo mostrou-se mais eficiente que os outros. Já o óleo de *S. montana* teve atividade antimicrobiana somente a partir da concentração de 5%. Cávar et al. (2008) apontam resultados diferentes aos desse estudo em relação a atividade antimicrobiana, em que o OE de *S. montana* foi mais eficiente contra *S. aureus* que a *E. coli*. Quanto maior a concentração utilizada, maiores foram os diâmetros dos halos inibitórios (Figuras 1 e 2), pois os componentes dos óleos apresentam-se mais concentrados. Apesar de vários trabalhos relatarem a atividade antimicrobiana de plantas do gênero *Citrus* (Fischer & Phillips, 2006), há poucos com informações da atividade antimicrobiana do OE de *C. limonia*. Pode-se atribuir o efeito antibacteriano dos óleos de *C. nardus* e *C. limonia* às altas quantidades de citronelal e limoneno, respectivamente. O mecanismo de ação desses compostos baseia-se principalmente em efeitos tóxicos na membrana celular, como a dissipação da força próton motiva, comprometendo a função no que diz respeito à permeabilidade seletiva (Sikkema et al., 1995).

Devido a natureza hidrofóbica e fenólica, timol e carvacrol, compostos majoritários do óleo de *S. montana*, interagem com a camada fosfolipídica da membrana citoplasmática e também com as proteínas da membrana bacteriana, causando o vazamento do material celular, tais como: ATP e ácidos nucléicos (Burt, 2004).

Estudos têm confirmado a influência dos fatores ambientais como determinantes na ação antimicrobiana dos OE, a exemplo de Celiktas et al. (2007) que relacionaram o aumento da atividade antimicrobiana do OE de *Rosmarinus officinalis*

TABELA 1. Valores médios de halos de inibição (mm) formados pela ação dos OEs de *Satureja montana*, *Cymbopogon nardus* e *Citrus limonia* Osbeck em diferentes concentrações.

Bactérias	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	S	C	L	S	C	L
Concentrações (%)						
DMSO (0,2%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,5	*	1,00 ^a	3,33 ^a	1,00 ^a	1,00 ^a	1,00 ^a
2,5	*	1,00 ^a	3,66 ^a	1,00 ^a	2,00 ^a	2,00 ^a
5,0	1,00 ^a	2,00 ^a	4,00 ^a	3,00 ^a	2,33 ^a	2,66 ^a
10,0	2,33 ^a	3,00 ^a	8,33 ^b	3,00 ^a	3,33 ^a	3,00 ^a
15,0	3,00 ^a	3,00 ^a	9,00 ^b	4,66 ^a	3,66 ^a	3,66 ^a
25,0	4,66 ^a	3,66 ^a	9,33 ^b	8,00 ^c	4,00 ^a	6,33 ^b
50,0	2,66 ^b	4,00 ^a	11,66 ^b	15,66 ^c	4,00 ^a	10,0 ^b

S: *Satureja montana*. C: *Cymbopogon nardus*. L: *Citrus limonia*. ^{a, b, c} Teste Tukey a 95% de significância para diferença de médias das zonas de inibição (mensuradas em milímetros), médias seguidas de mesma letra não diferem entre si significativamente na mesma linha* ausência de halo inibitório

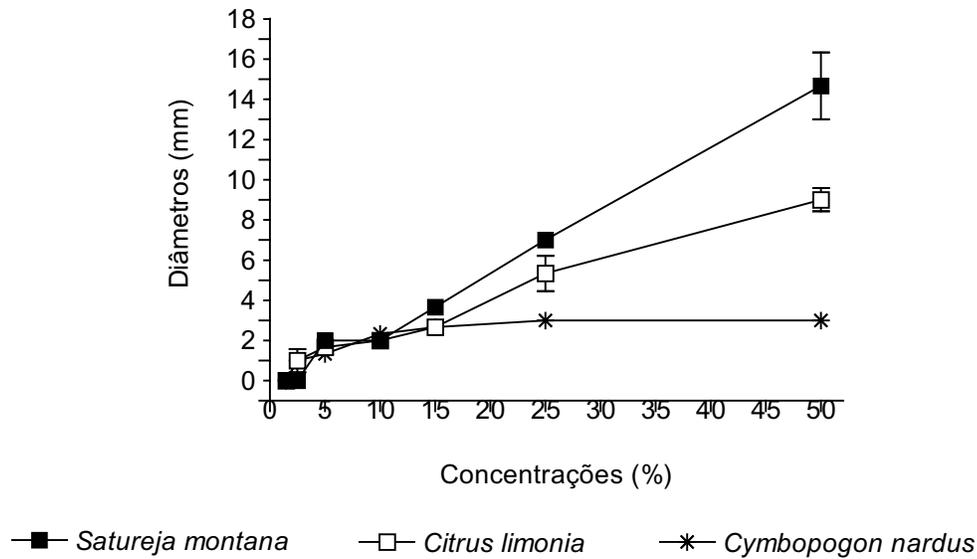


FIGURA 1. Zonas de inibição (mm) em função das concentrações de diferentes óleos essenciais sobre *Escherichia coli*. Valores médios \pm Desvio padrão (barras).

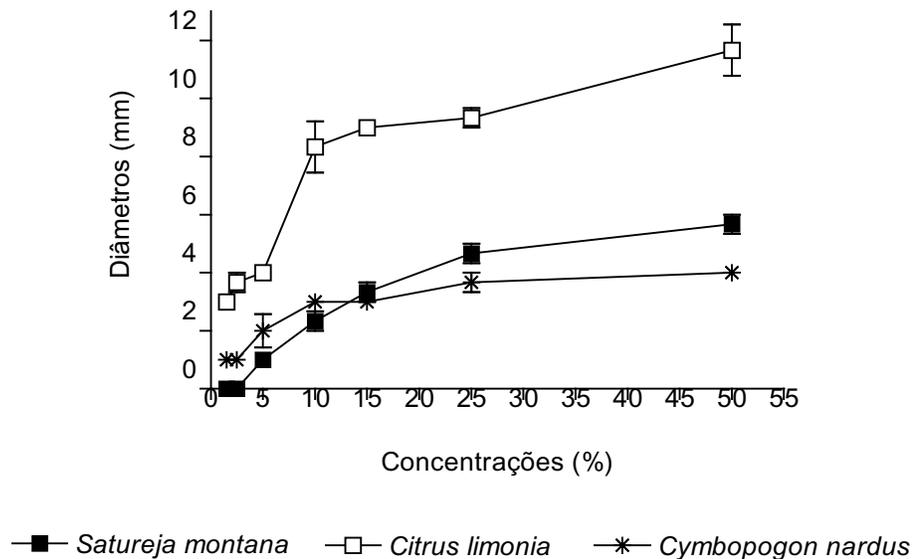


FIGURA 2. Diâmetros em função das concentrações de óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus*. Valores médios \pm Desvio padrão (barras).

em amostras coletadas na primavera. Moon et al. (2006) verificaram variação significativa no tamanho dos halos de inibição quando testaram a atividade antimicrobiana do OE de diferentes amostras de *Lavandula angustifolia* frente aos mesmos microrganismos. A atividade antimicrobiana de um óleo pode ser, às vezes, bem diferente. Para uma espécie em particular, por exemplo, os valores de CIM determinados para OEs de quimiotipos de *Thymus vulgaris* diferem quando se usam outras linhagens de um mesmo microrganismo (Janssen et al., 1987).

Nguefack et al. (2004) relatam maior atividade antibacteriana do óleo de *C. citratus* quando

comparado a *Z. officinales* utilizando a metodologia de difusão em disco. No presente estudo, no qual também foi utilizada metodologia de disco-difusão, a maior ação inibidora foi obtida pelo óleo OE do *S. montana* contra *E. coli* e *C. limonia* para *S. aureus*. Diferenças entre resultados podem ocorrer mesmo quando se utiliza a mesma metodologia, pois existem também diferenças quanto à sensibilidade de linhagens de um determinado microrganismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal.

CONCLUSÃO

Os OEs apresentaram ação antibacteriana,

sendo que *S. aureus* teve maior sensibilidade ao óleo essencial de limão e *E. coli* ao óleo de *S. montana*. Os resultados *in vitro* sugerem o uso potencial destes óleos como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro na execução do projeto.

REFERÊNCIA

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils componets by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing.2007, 803p.
- CASTRO, L.O.; RAMOS, R.L.D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf, capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J. F. Watson, palmarosa, *Cymbopogon nardus* (L.)Rendle, citronela, *Eleonurus candidus* (Trin.) Hack., capim limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver**. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003, 23p.
- CÁVAR, S.et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**. v.111, 648-53,2008.
- CELIKITAS, O.Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry** v.100,p.553-9, 2007.
- ČETKOVIĆ, G.S. et al. HPLC Screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, p.293-306, 2007.
- COSTA, A. G. **Desenvolvimento vegetativo, rendimento e composição do óleo essencial de Patchouli após a adubação nitrogenada**. 2008. 92p. Dissertação (Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- CRAVEIRO, A. A. et al. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: UFC, 1981, 210p.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, 1232-40, 2006.
- FRATERNALE, D. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from central italy. **Chemistry of Natural Compounds**, v.43, 622-8, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**, v.30, 374-81, 2007.
- GUIMARÃES, L.G.L.et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*(D.C.) Stapf). **Química Nova**. v.31, n.6, p.1476-80, 2008.
- JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. In: Aspects of the test methods. **Plantas Medicinais**. v.53, 395-98, 1987.
- KIM, J.M.et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v.60, 1364-8, 1995.
- LADANIYA, M. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2008, 558 p.
- MARCO, C.A. et al. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.3, p.429-32, 2007.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**.Viçosa: UFV, 2003, 220p.
- MILLEZI, A. F., et al. 2012a. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* agains five important foodborne pathogens. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pp. 0-0. Epub Feb 24, ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/S010120612012005000021>.
- MILLEZI, A. F., et al. 2012b. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless stell surface by essential oils. *Brazilian Journal Microbiology*, xx, xxx-xxx.
- MOON, T.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Antibacterial activity of essential oils, hidrosols an plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **International Journal Aromatherapy**, v.16, p.9-14, 2006.
- NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. **Revista de Higiene Alimentar**. v.14, p.32-5, 2000.
- NATTA, L. et al. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. **International Food Research Journal**, v.15, n.3, p.337-46, 2008.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M7-A6, Wayne, Pa, USA, 2003.
- NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmatic membrane of *Listeria innocua* examined by low cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.395-400, 2004.
- 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, p.549-53, 2010.
- OLIVEIRA, T.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, p.546-55, 2011.
- SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, 8022-8, 1994.

- PRIETO, J.M. et al. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Satureja montana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. **Food Chemistry**. v. 104, p.889-95, 2007.
- PIMENTEL, F.A. et al. A convenient method for the determination of mixture in aromatic plants. **Química Nova**, v.29, n.2, 373-5, 2006.
- SPETHMANN, C.N. **Medicina alternativa de A a Z**. 7.ed. Uberlândia: Natureza, 2004, 392p.
- SILVA, F.V.M. et al. Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Satureja montana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p.11557-63, 2009.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004, p. 467-95.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v.18, 463-70, 2001.
- TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p.1-5, 2005.