

Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal

QUEIROZ, M.R.A.¹; ALMEIDA, A.C.^{2*}; ANDRADE, V.A.³; LIMA, T.S.¹; MARTINS, E.R.²; FIGUEIREDO, L.S.²; CARELI, R.T.²

¹Graduanda em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Campus Montes Claros, MG.

²Docente da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Universitária 1000. Montes Claros, MG. Cep 39404-006.

³Residente Pós-doutoral. Universidade Federal de Minas Gerais. Campus Montes Claros, MG.

RESUMO: Objetivou-se no trabalho avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à isolados de *Staphylococcus* sp. de alimentos de origem animal. Para tanto, realizou-se análise química da composição do óleo, teste de sensibilidade das bactérias frente a dez antibióticos de uso terapêutico e ao óleo essencial de *Lippia origanoides*, além da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). A análise cromatográfica do óleo apresentou o timol como composto majoritário (48,70%), além de pequena quantidade de carvacrol (1,14%). No teste de sensibilidade frente aos antibióticos, 75% dos isolados apresentaram resistência a, no mínimo, três antibióticos. Em relação ao óleo essencial, os isolados de *Staphylococcus* sp oriundos de leite bovino mostraram-se mais resistentes e os isolados de carne ovina apresentaram-se mais sensíveis. A CIM foi maior para os *Staphylococcus* sp. isolados de leite bovino e leite ovino (60µL/mL). Enquanto que para os isolados de carcaça de ovinos e queijo, a CIM foi de 15µL/mL e 30µL/mL respectivamente. A CBM, conseqüentemente, foi maior para os isolados de leite bovino e leite ovino, sendo de 240µL/mL e 120µL/mL respectivamente. O óleo essencial de *Lippia origanoides* apresenta atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos.

Palavras chave: sensibilidade, antibióticos, alecrim pimenta

ABSTRACT: Assessment of the antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* in relation to *Staphylococcus* sp. isolated from food of animal origin. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* in relation to *Staphylococcus* sp. isolated from food of animal origin. For this purpose, we performed the chemical analysis to determine the oil composition, evaluated the bacteria sensibility to ten antibiotics of therapeutic use and determined the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The chromatographic analysis showed that tymol was the main compound (48.70%) and that carvacrol was present in a small amount (1.14%). In the test of antibiotic susceptibility, 75% of the microorganism isolates were resistant to at least three of the ten antibiotics tested. The *Staphylococcus* sp isolated from bovine milk was more resistant to the essential oil of *Lippia origanoides*, and the microorganism isolated from sheep meat was more susceptible to this oil. The *Staphylococcus* sp. isolated from bovine or sheep milk showed a MIC of 60µL/mL and for those isolated from sheep carcass and cheese the MIC was 15µL/mL and 30µL/mL, respectively. Consequently, the MBC was higher for isolates from cow's (240µL/mL) and sheep's milk (120µL/mL) when compared with other food sources. These results suggest that the essential oil of *Lippia origanoides* has antimicrobial activity against *staphylococcus* sp. isolated from food.

Keywords: sensitivity, antibiotics, *Lippia origanoides*.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais, os ácidos orgânicos e óleos das especiarias possuem ação inibitória e antisséptica comprovada e revelaram nova

perspectiva para seu emprego. Na indústria de alimentos são usados como conservantes podendo ainda eliminar células viáveis em superfícies de

bancadas, equipamentos, utensílios e alimentos sólidos, como a carne (Pereira et al., 2008).

O alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) também conhecido como alecrim-do-nordeste e estrepa-cavalo, é um arbusto medicinal pertencente à família *Verbenaceae* nativa do semiárido nordestino e do norte de Minas Gerais, possui altura média de 3m, folhas simples com pelos esbranquiçados na face inferior e flores brancas (MARTINS et al., 2002). As folhas apresentam 4% de óleo essencial (COSTA, 2006), cuja composição tem cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol, ambos agentes antimicrobianos, além de outros componentes químicos como flavonóides e quinonas (LORENZI; MATOS, 2002).

A planta possui elevado valor terapêutico devido à atividade antimicrobiana comprovada. É muito utilizada na medicina popular brasileira como agente anti-infeccioso, principalmente para infecções da garganta, gastroentéricas, da pele e couro cabeludo (Costa et al., 2001), além de ser usado como analgésico, sedativo e expectorante (COSTA, 2006; MARTINS et al., 2002).

Entre as plantas com potencial de uso, o alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) está na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) publicada em janeiro de 2009 pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2009).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial e de extratos de *Lippia origanoides* contra vários fungos, bactérias e outros microrganismos já foi comprovada por diversos autores (Silva et al, 2010; Cavalcanti et al, 2010; Reis et al, 2011; Fernandes et al, 2012, entre outros). Entre os microrganismos mais testados estão: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*. Atividades acaricidas foram relatadas por Cavalcanti et al (2010) e atividade moluscicida e larvicida contra *Biomphalaria glabrata* e *Aedes aegypti* também é relatado em Matos e Oliveira (1998).

A intoxicação estafilocócica é a causa mais freqüente de surtos de doenças microbianas transmitidas por alimentos, em muitos países. Surtos e de intoxicação atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm casos esporádicos sido relatados em vários países (Carmo et al., 2002).

No presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito antibacteriano do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente a *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal, visando perspectivas de uso como sanitizante na indústria de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

A planta foi coletada em área de reserva do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes Claros, MG (coordenadas 16°40'51,5"S e 43°50'32,1"W, altitude de 640m) e possui exsicata no Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais sob registro 56526. O óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*) foi obtido a partir das folhas da planta, por meio da técnica de destilação por arraste de vapor em destilador piloto (Linax®, modelo D20). Após três horas de extração, o óleo foi separado do hidrolato por partição líquido-líquido, retirado com micropipeta e acondicionado em frascos âmbar estéreis e mantidos sob refrigeração.

A separação e a quantificação (método de normalização de área) das substâncias foram realizadas por cromatografia gasosa em cromatógrafo com detector de ionização de chama (CG-DIC, Shimadzu, GC-2010), coluna capilar DB-5 (J&W Scientific; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm); A identificação das substâncias foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando por impacto de elétrons (70eV), coluna OV-5 (Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.; 30,0m x 0,25mm x 0,25µm). A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist. 62 lib.) e o índice de retenção de Kovats (Adams, 2007). Para a obtenção dos índices de retenção das substâncias (IR) empregou-se uma mistura padrão de hidrocarbonetos (C₉-C₂₄), injetados nas mesmas condições operacionais das amostras, aplicando-se a equação de Van Den Dool; Kratz (1963).

Foram obtidas 16 linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite bovino, leite de ovinos, carcaça de ovinos e queijo "minas frescal", sendo duas *Staphylococcus* sp. de teste coagulase positiva e duas *Staphylococcus* sp. de teste coagulase negativa de cada alimento, todas adquiridas por meio de pesquisas anteriores realizadas no laboratório de microbiologia aplicada do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para o teste de sensibilidade antimicrobiana, utilizou-se a técnica de difusão em disco descrita por Bauer et al. (1966), utilizando os antibióticos: neomicina 10µg, eritromicina 15µg, clindamicina 02µg, penicilina 10U, sulfazotrim 25µg, tetraciclina 30µg, vancomicina 30µg, gentamicina 10µg, norfloxacin 10 µg e ciprofloxacina 05µg, todos da marca Laborclin®. Os resultados foram interpretados de acordo com recomendações do fabricante Diante dos resultados, determinou-se o Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA),

descrito por Krumperman (1983).

Para a avaliação da sensibilidade das bactérias ao óleo essencial de alecrim-pimenta fez-se o teste de 06 concentrações distintas. A concentração máxima de óleo testada foi 120 $\mu\text{L}/\text{mL}$, obtida segundo metodologia proposta por Oliveira et al. (2006), na qual são utilizados 600 μL do óleo, 40 μL de Tween 80 e o volume completado para 5 mL com água destilada estéril. A primeira solução foi agitada por 5 minutos com o auxílio do vórtex. Em seguida, pelo método de diluição seriada foram obtidas as concentrações de 60 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 7,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 3,75 $\mu\text{L}/\text{mL}$. O teste foi realizado pela técnica de disco-difusão. Foram utilizados discos de papel de filtro Whatman número um, 6mm de diâmetro, estéreis saturados com 10 μL do óleo nas concentrações citadas anteriormente. O inóculo foi preparado e padronizado para 0,5 da escala de Mac-Farland, correspondendo a 10⁶ UFC/mL, em meio ágar Mueller Hilton, espalhados com o auxílio de swabs estéreis. Foi feita a leitura dos halos em milímetros após 24 horas de incubação a 37°C usando régua milimetrada.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por meio do método de Macrodiluição (tubo) em caldo (NCCLS, 2003). As concentrações do óleo foram preparadas usando o caldo infuso cérebro coração (caldo BHI) conforme metodologia descrita anteriormente, substituindo a água estéril pelo caldo BHI. 12,5 μL do inóculo padronizado para 0,5 na escala McFarland foi adicionado a cada tubo e os mesmos foram incubados a 37°C por 24 horas. Após este período foi determinada a CIM de

acordo com a turvação do meio. As amostras foram comparadas com os controles positivo (inoculação bacteriana sem adição do óleo) e controle negativo (diluição do óleo sem a presença do microrganismo).

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizado o plaqueamento da amostra em meio Triple Soy Ágar (TSA), por meio de alça bacteriológica, de todas as diluições do óleo em que não houve crescimento para a CIM. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e fez-se a contagem das colônias. Para as amostras onde houve crescimento até na concentração de 120 $\mu\text{L}/\text{mL}$, foi repetido o teste na concentração de 240 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (NCCLS, 2003).

Os resultados do teste de sensibilidade foram expressos como média dos valores \pm desvio padrão analisados pelo Prisma (GraphPad Software, San Diego, CA). Significância estatística foi testada usando Student's teste ou ANOVA seguido por teste Bonferroni, valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cepas de *Staphylococcus sp.* coagulase positiva estudadas, 75% apresentaram sensibilidade à gentamicina e 100% das mesmas foram sensíveis à ciprofloxacina, eritromicina, oxacilina e norfloxacina. O IRMA variou de 0,2 a 0,6 e 75% dos isolados em geral apresentaram resistência a no mínimo três bases antibióticas, conforme apresentado na Figura 1.

Segundo Oliveira (2011), teste de susceptibilidade aplicado à cepas de *Staphylococcus*

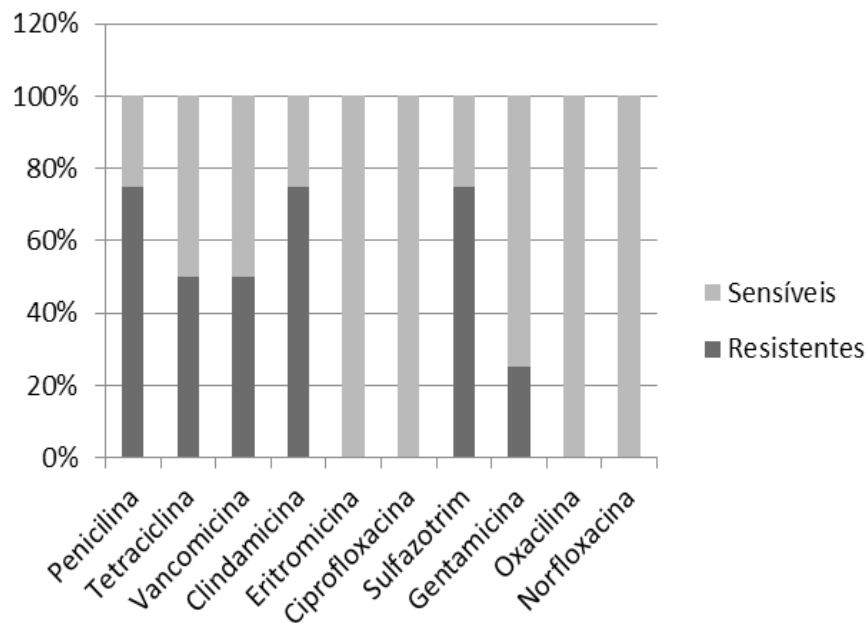


FIGURA 1. Perfil da sensibilidade e resistência antimicrobiana de *Staphylococcus sp.* coagulase positiva (A) e coagulase negativa (B) isoladas de alimentos de origem animal dado em percentagem.

sp. coagulase positiva apontaram a gentamicina como o antibiótico mais eficaz, com 100% de sensibilidade, seguida pela ciprofloxacina com 88,8%. O IRMA para as cepas de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva, variou de 0,42 a 0,71 e 67% dos isolados mostraram-se resistentes a no mínimo três antibióticos.

Em relação à penicilina, 100% dos *Staphylococcus* sp. coagulase negativa e 75% dos *Staphylococcus* sp. coagulase positiva apresentaram resistências. No geral, 100% das cepas foram sensíveis a oxacilina e eritromicina. Resultados semelhantes foram encontrados por Tavares (2000), que cita uma resistência superior a 70% de *Staphylococcus* sp. à classe das penicilinas. Entretanto, cita sensibilidade à oxacilina (acima de 80%) para *Staphylococcus aureus* isolados em meio extra-hospitalar no Brasil.

Os resultados da cromatografia gasosa do óleo essencial de *Lippia origanoides* são descritos na Figura 2. O Timol foi o principal agente bacteriano presente no óleo extraído das folhas de *Lippia origanoides* (48,70%), reconhecido antimicrobiano por Burt (2004). Porém, verificou-se também a presença, em pequena quantidade do carvacrol (1,14%), cuja atividade antimicrobiana é citada por Cimanga et al. (2002). Estudos realizados por Aquino (2011) com plantas da mesma espécie e coletadas na mesma região apontam o Timol como composto majoritário (30,24%) no óleo essencial de *Lippia origanoides*.

A diferença na composição dos óleos essenciais de uma mesma espécie é associada a uma variedade de fatores. Segundo Moraes (2009), caracteres genéticos, idade e alguns fatores climáticos e ambientais, podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos

secundários pelas plantas. Dependendo do ambiente onde a planta se encontra, os estímulos podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, alterando o teor e a composição química dos óleos essenciais.

No teste de sensibilidade das amostras ao óleo do alecrim pimenta pela técnica de difusão em discos, os isolados de leite bovino foram menos sensíveis, visto que, apresentaram halos de inibição de 8 a 10mm apenas nas concentrações de 120 e 60 μ L/mL; Enquanto que nos isolados de carne ovina os halos foram de 8 a 12mm nas concentrações de 120, 60, 30, e 15 μ L/mL.

Oliveira et al. (2006) avaliaram a atividade do óleo essencial da *Lippia origanoides* na inibição do crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* observando halos de inibição do crescimento bacteriano entre 15-21 mm.

A ação antimicrobiana do extrato de alecrim pimenta foi testada por Silva (2010) frente a isolados biológicos de *Staphylococcus aureus* e todos os isolados ensaiados foram sensíveis ao extrato da *Lippia origanoides*. A CIM observada pela formação dos halos de inibição ocorreu até a diluição de 1:16 variando de 9 a 27 mm de diâmetro.

A comparação do perfil de sensibilidade entre as cepas de *Staphylococcus* sp. coagulase positiva e *Staphylococcus* sp. coagulase negativa é apresentada na Figura 3.

As cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite bovino apresentaram maior resistência ao óleo essencial, em contrapartida, as cepas isoladas de carcaça de ovinos apresentaram maior sensibilidade. Quando comparadas as bactérias nas diferentes fontes de isolamento, verificou-se que os *Staphylococcus* sp. coagulase negativa apresentaram diferença no perfil de sensibilidade

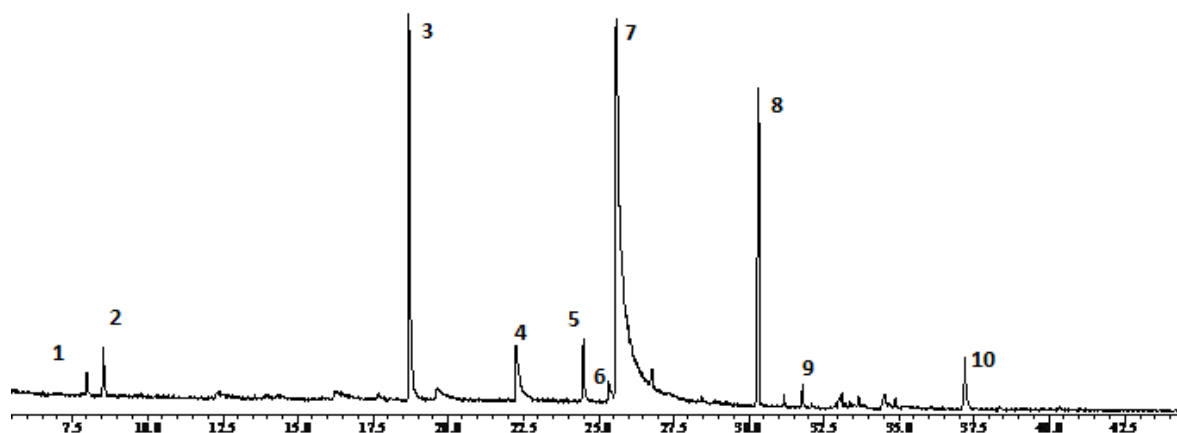


FIGURA 2. Cromatograma do óleo essencial de *Lippia origanoides* analisado por cromatografia gasosa com detector de massa. Os compostos detectados foram os seguintes: 1- alfa-pineno, 2- canfeno, 3- borneol, 4- não identificado, 5- acetato de borneol, 6- carvacrol, 7- timol, 8- trans-cariofileno, 9- beta-selineno, 10- óxido de cariofileno

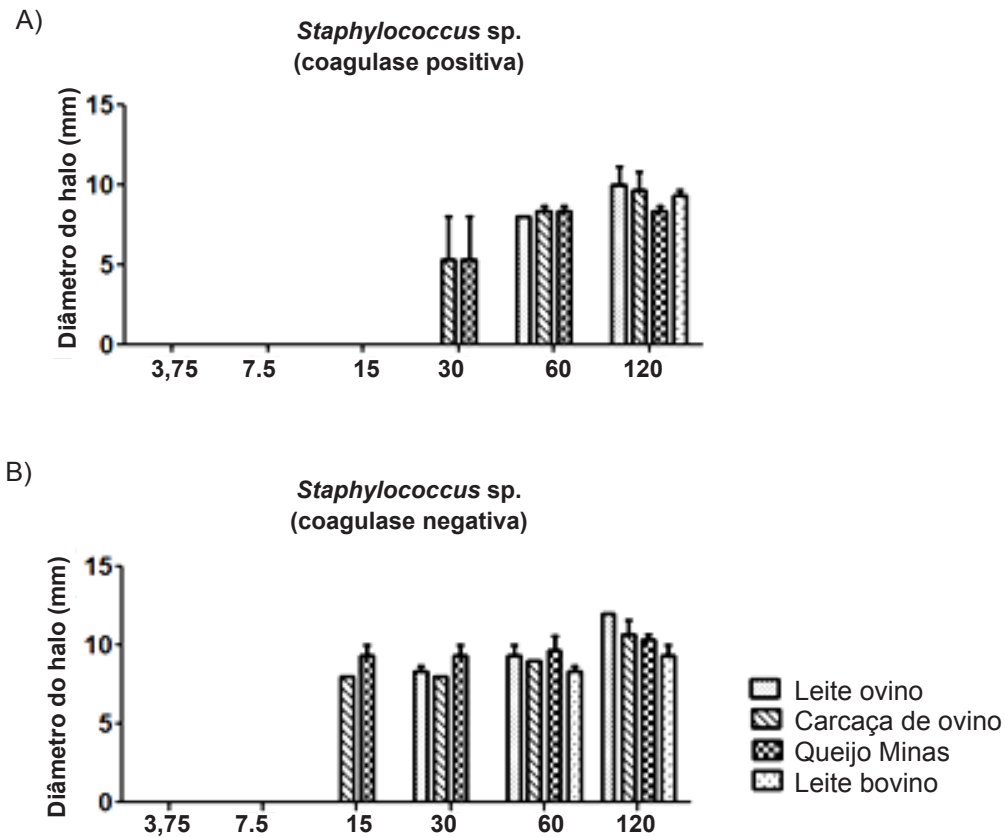


FIGURA 3. Análise das médias dos halos de inibição das cepas de *Staphylococcus sp.* A) coagulase positiva e B) coagulase negativa isoladas do leite ovino, carcaça de ovino, queijo minas e leite bovino frente a diferentes concentrações de óleo de alecrim-pimenta.

em concentrações acima 15µL/mL, enquanto que os *Staphylococcus sp.* coagulase positiva apresentaram diferença no perfil de sensibilidade apenas em concentrações acima de 30µL/mL, mostrando-se mais resistentes ao óleo essencial.

Segundo Burt (2004), o mecanismo de ação dos óleos essenciais ainda não foi estudado com detalhes, mas os óleos essenciais que apresentam maior atividade sobre patógenos alimentares têm sido aqueles que possuem altas quantidades de compostos como timol, eugenol e carvacrol. Acredita-se que estes compostos poderiam causar distorções na estrutura física da célula devido ao seu efeito contra a membrana plasmática modificando a sua permeabilidade.

A atividade antimicrobiana já não é atribuída apenas ao composto majoritário. A sinergia entre os compostos dos óleos essenciais na atividade antimicrobiana é citada por Maciel et al. (2002) e Bakkali et al. (2008). Segundo eles, isso pode acontecer devido ao fato de o óleo essencial ser uma mistura de compostos muito complexa.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi maior para os *Staphylococcus sp.* isolados de leite bovino e leite ovino (60µL/mL). Enquanto que para

os isolados de carcaça de ovinos e queijo artesanal, a CIM foi de 15µL/mL e 30µL/mL respectivamente. A maior resistência das bactérias isoladas de leites pode estar relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de doenças como mastite. Para Masurani & Tavares (2007), o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi conseqüentemente maior para os *Staphylococcus sp.* isolados de leite bovino e ovino, que foi de 240µL/mL e 120µL/mL, respectivamente. Enquanto que, para os *Staphylococcus sp.* isolados de queijo e carne de ovinos a CBM foi de 60µL/mL e 15µL/mL, respectivamente.

Castro et al.(2011), mostraram que o óleo essencial de *Lippia organoides* teve alta atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de queijo artesanal; A concentração inibitória mínima (CIM) encontrada foi de 13µL/mL para todas as bactérias testadas e a concentração bactericida mínima (CBM) foi de 25µL/mL.

O uso de óleos essenciais como agentes

antimicrobianos apresenta como principais características a sua origem natural, o que significa mais segurança para os usuários e o meio ambiente; e um baixo risco de aumento da resistência microbiana à sua ação, visto que, os óleos essenciais são misturas de vários compostos que, aparentemente apresentam ação antimicrobiana diferentes, tornando mais difícil a adaptação microbiana (Daferera et al., 2003). O uso de plantas, especiarias, óleos essenciais e frutos com ação antimicrobiana ainda é remota se comparada com o uso de aditivos sintéticos por várias razões: poucos dados sobre o efeito na alimentação humana, odor marcante e alto custo (Tajkarimi et al., 2010).

CONCLUSÃO

O óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia organoides*) apresenta atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos. Estudos futuros podem avaliar seu efeito bactericida e uso como sanitizante no controle desse microrganismo, além da toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

AGRADECIMENTO

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brasil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq/UFMG) e ao Laboratório de Química Instrumental, ICA-UFMG.

REFERÊNCIA

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 803 p.
- AQUINO, C. F. **Ação de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) do maracujazeiro-amarelo**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2011.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, 446–475, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. acesso em: 13 nov.2011.
- BAUER, A.W. *et al.* Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>.

- gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 14 jun. 2011.
- CARMO, L.S. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.9-14, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 28 jul. 2011.
- CASTRO, C.E. *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol.13, n.3, pp. 293-297, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 14 jan. 2012.
- CAVALCANTI, S.C.H. *et al.* Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Biores. Technol.** 101, 829–832, 2010.
- CIMANGA, K. 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, p. 213–220, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 11 jan. 2012.
- COSTA, A. S. **Sustentabilidade da produção de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação *in vitro***. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos Naturais. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, 2006.
- COSTA, S.M.O. *et al.* Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **J. Natural Products**, 64, 792–795, 2001.
- DAFERERA, D.J. *et al.* The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22. p. 39-44, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 12 fev. 2012.
- FERNANDES, L.P. *et al.* Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and bioproducts processing**, 90, 425–432, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 30 mar. 2014.
- KRUMPERMAN P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 165-170, 1983.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 512 p, 2002.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 10 dez. 2011.
- MASURANI, A.; TAVARES, L.C. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente

- a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.101-16, 2007. Disponível em: < <http://www.scielo.br>>. Acesso em: 07 jan. 2012.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; EVANGELISTA, D. J. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2002, 220 p.
- Matos, F.J.A., Oliveira, F. *Lippia sidoides* Cham: farmacognosia, química e farmacologia (in Portuguese). **Rev. Bras. Farmacogn.** 70, 84–87, 1998.
- MORAIS L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, 27:4050-4063, 2009.
- OLIVEIRA, L. **Efeito inibitório dos óleos essenciais de alfavacão (*Ocimum gratissimum* L.) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.) e do suco de limão (*Citrus latifolia* Tanaka) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de carcaças de ovinos**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2011.
- NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 6ª Ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS, 940. West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898. United States of America (USA), 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_publicacoes_bac_cresc.pdf>. Acesso em: 23 out. 2009.
- OLIVEIRA, P.F. *et al.* Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Brazilian journal of Pharmacognosy**, v.16, n.4, p 510-516, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 11 jan. 2012.
- PEREIRA, A. A. *et al.* Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008. Disponível em:<<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 02 dez. 2011.
- REIS, F.D. *et al.* Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **Int. J. Food Microbiol.** 146, 228–234, 2011.
- SILVA, V.A. *et al.* Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, vol.12, n.4, pp. 452-455, 2010. Disponível em: < <http://www.scielo.br>>. Acesso em: 12 dez. 2011.
- TAJKARIMI, M. M. *et al.* Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199–1218, 2010. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 12 jan. 2012.
- TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000. Disponível em:< <http://www.scielo.br>>. Acesso em: 06 dez. 2011.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-467, 1963.