



Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar

Antimicrobial activity of the essential oils and isolated compounds on the hospital-borne and foodborne pathogens

RIALA6/1719

Caio Henrique da Silva SANTOS¹, Roberta Hilsdorf PICCOLI², Victor Maximiliano Reis TEBALDI^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Centro Universitário de Barra Mansa, Rua Vereador Pinho de Carvalho, 267, Barra Mansa, RJ, Brasil. CEP: 27330-550. Tel: 24 33250222. E-mail: victormaxibio@yahoo.com.br

²Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, Brasil

Recebido: 24.03.2017 - Aceito para publicação: 26.07.2017

RESUMO

Os óleos essenciais de plantas demonstram atividade antimicrobiana frente a diversos micro-organismos, e são considerados como alternativa ao uso de antibióticos convencionais. Este estudo testou a eficácia de óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon nardus*), além dos compostos isolados citral contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e citral e carvacrol contra *Pseudomonas aeruginosa*. Empregou-se o método de microdiluição em Caldo Trypticaseína de Soja (TSB) em placa de 96 cavidades para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e posterior semeadura em Ágar Trypticaseína de Soja (TSA) para definir a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os inóculos foram padronizados (10^7 UFC/mL) de acordo com a escala de MacFarland. Os óleos essenciais de canela, orégano e citronela mostraram atividade antimicrobiana contra os dois microrganismos em diferentes concentrações. O óleo essencial de cravo-da-índia não apresentou efeitos inibitórios nas concentrações testadas. O carvacrol inibiu *P. aeruginosa* a partir da concentração 1,25 %. O citral inibiu *S. aureus* a partir da concentração 0,03 %, porém não apresentou atividade contra *P. aeruginosa*. O óleo essencial de citronela e o composto citral foram mais eficazes contra *S. aureus*. Para *P. aeruginosa*, o óleo essencial de canela apresentou atividade antimicrobiana nas menores concentrações.

Palavras-chave. óleos essenciais, extratos de plantas, agentes antimicrobianos, resistência microbiana a medicamentos.

ABSTRACT

Essential oils of plants have demonstrated antimicrobial activity against various microorganisms, as an alternative to the use of conventional antibiotics. This study aimed at testing the effectiveness of essential oils of cinnamon (*Cinnamomum cassia*), oregano (*Origanum vulgare*), clove (*Syzygium aromaticum*), citronella (*Cymbopogon nardus*), plus the major compound citral against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and citral and carvacrol against *Pseudomonas aeruginosa*. Tests were performed through the microdilution method in Trypticase Soy Broth (TSB) in 96 well plates to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and then seeded in Trypticase Soy Agar (TSA) for determining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The inocula were standardized (10^7 CFU/mL) according to the MacFarland scale. The essential oils of cinnamon, oregano and citronella showed activity against both microorganisms at different concentrations. The essential oil of clove showed no inhibitory effects. The carvacrol inhibited the growth of *P. aeruginosa* at the concentration of 1.25 %. Citral inhibited *S. aureus* from 0.03 % concentration; however, it did not exhibited activity against *P. aeruginosa*. The essential oil of citronella and the citral compound were the most effective against *S. aureus*, while the essential oil of cinnamon showed antimicrobial activity at the lowest concentrations against *P. aeruginosa*.

Keywords. essential oils, plant extracts, antimicrobial agents, drug resistance microbial.

INTRODUÇÃO

Dentre as grandes preocupações da Saúde Pública nos dias atuais destacam-se as doenças infecciosas de origem clínica e alimentar. Doenças de origem alimentar são resultado da ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos ou substâncias químicas. A manifestação clínica mais comum das doenças de origem alimentar assume a forma de sintomas gastrointestinais; entretanto, podem também apresentar sintomas relacionados a distúrbios neurológicos, ginecológicos, imunológicos, entre outros. Diversos patógenos são conhecidos por causarem doenças quando veiculados a alimentos e água, entre os quais as bactérias constituem um grande grupo de micro-organismos causadores de doenças, com destaque para *Staphylococcus aureus*. Estima-se que 25 % da população humana seja portadora permanente deste micro-organismo. Uma vez instalado em seu hospedeiro, pode causar uma enorme variedade de sintomas clínicos, afetando a pele, pulmões, coração, sistema nervoso central, ossos e articulações, corrente sanguínea e trato gastrointestinal¹. A intoxicação alimentar estafilocócica manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas, sendo que para a produção de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação são necessárias entre 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* por grama de alimento².

Com relação ao ambiente hospitalar, este além de permitir a seleção de agentes infecciosos resistentes em decorrência do uso indiscriminado de antimicrobianos e por reunir pessoas com diferentes vulnerabilidades à infecção, apresenta intensa realização de procedimentos invasivos, aspectos que o caracterizam como um ambiente favorável à propagação das infecções hospitalares³.

Dentre os principais patógenos de infecção hospitalar, destacam-se as espécies de *Pseudomonas*, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* o principal micro-organismo de interesse clínico⁴, devido sua capacidade de adaptação às condições de nutrição, temperatura e umidade disponíveis no ambiente, bem como sua resistência intrínseca ou adquirida

a diversos antimicrobianos e desinfetantes⁵, sendo oportunista e podendo causar infecções urinárias, dermatites e uma grande variedade de infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos⁶. Outra característica marcante e preocupante desta espécie é a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos^{7,8}.

A resistência às drogas antimicrobianas é causada pela mutação espontânea e recombinação gênica, que desenvolvem variedades genéticas onde a seleção natural acontece dando vantagens às mais resistentes. A resistência microbiana aos antibióticos tornou-se um problema de saúde pública mundial, que ocasiona diminuição da eficácia dos antibióticos e, uma vez que os micro-organismos se tornam resistentes aos medicamentos de primeira linha, torna-se necessário o uso de farmacoterapias de custos mais elevados^{9,10}, sendo que em algumas regiões do mundo, infecções são resistentes a todos antibióticos conhecidos¹¹.

A resistência cada vez maior de micro-organismos aos produtos químicos e drogas convencionais levou os cientistas a pesquisarem novas fontes de antimicrobianos com atividades de amplo espectro¹². Os óleos essenciais contêm uma vasta série de metabólitos secundários que podem inibir ou retardar o crescimento de bactérias, leveduras e bolores, cujos componentes têm uma variedade de alvos de ação, particularmente sobre a membrana e o citoplasma microbiano, e em certas situações alteram completamente a morfologia das células¹²⁻¹⁴, podendo ser uma alternativa ao uso de pesticidas sintéticos e como conservantes de alimentos^{15,16}. Os óleos essenciais são líquidos voláteis, de cor límpida, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos que têm densidade inferior à da água. Eles podem estar presentes em todos os órgãos de plantas, incluindo botões, flores, folhas, sementes, ramos, caules, flores, frutos, raízes ou casca, mas geralmente estão armazenados em células secretoras, cavidades, canais, tricomas glandulares ou células epidérmicas. Estas plantas em geral

são conhecidas por seus efeitos antioxidantes, bem como por suas propriedades antissépticas, medicinais e pela fragrância, sendo muitas vezes usadas na preservação de alimentos e como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolíticos¹⁶.

Existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de microdiluição e método de microdiluição.

O trabalho visou avaliar a eficácia da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), citronela (*Cymbopogon nardus*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e os compostos isolados citral e carvacrol, sobre bactérias patogênicas (*P. aeruginosa* e *S. aureus* ATCC 25923) por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) e verificar, dentre os compostos testados, aqueles que apresentam maior potencial de uso como antimicrobiano.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa desenvolvida foi dispensada da submissão ao Comitê de Ética por não envolver, de forma direta, pesquisas em seres humanos ou animais.

Micro-organismos, manutenção e preparação do inóculo

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram *S. aureus* ATCC 25923, cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras e *P. aeruginosa* isolada de aspirado traqueal, pertencente à coleção de culturas do laboratório de um hospital do Sul Fluminense – RJ, gentilmente cedida para a realização do estudo.

As culturas estoque foram mantidas em meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g e água destilada: 100 mL) à -18 °C.

Para a reativação das cepas, foram inoculados 10 µL da cultura estoque em tubos contendo 3 mL

de caldo TSB (Caldo Trypticaseína de Soja) e incubados a 37 °C por 24 h. Após período de incubação, procedeu-se o crescimento em TSA (Ágar Trypticaseína de Soja). As suspensões bacterianas foram padronizadas para conter 10⁷ UFC/mL, por meio da escala de MacFarland.

Óleos essenciais e compostos isolados

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*), canela (*C. cassia*) e orégano (*O. vulgare*) foram adquiridos de FERQUIMA[®] Indústria e Comércio Ltda. O óleo essencial de citronela (*C. nardus*) foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Guimarães et al¹⁷ e caracterizado por cromatografia em fase gasosa no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Os compostos fenólicos citral e carvacrol foram adquiridos de Sigma-Aldrich[®]. Os componentes majoritários dos óleos essenciais, conforme especificado pelo fornecedor, foram: a) para o óleo de cravo-da-índia: eugenol (84 %), beta-cariofileno (6 %), acetato de eugenila (8 %); b) para o óleo essencial de canela: aldeído cinâmico (81 %), cumarina (3 %), benzaldeído (3 %), álcool cinâmico (3 %), estireno (3 %); c) para o óleo essencial de orégano: carvacrol (71 %), γ-terpineno (4,5 %), β-cariofileno (4 %), p-cimeno (3,5 %), timol (3 %). O óleo essencial de citronela, após quantificação e caracterização de seus componentes, apresentou os seguintes compostos majoritários: geraniol (33,7 %), citronelal (23,2 %), β-citronelol (14,2 %), elemol (3,6 %) e β-elemeno (3,6 %). A diluição dos óleos essenciais e compostos majoritários foi realizada na proporção 10 µL para 990 µL de TSB para *S. aureus* e na proporção de 50 µL para 950 µL de TSB para *P. aeruginosa*. Em cada diluição foi acrescida o emulsificante Tween 80 (0,5 %)¹⁸.

Determinação das Concentrações Inibitória Mínima (CIM) e Bactericida Mínima (CBM)

O experimento foi conduzido em triplicata e realizado no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Análises Clínicas do Centro Universitário de Barra Mansa.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-índia,

orégano e compostos fenólicos citral e carvacrol foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo realizada em microplacas de 96 cavidades, utilizando caldo TSB + 0,5 % de Tween 80, de acordo com o NCCLS (M7-A6)¹⁹. As concentrações finais (em %) dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-índia, orégano e composto fenólico citral para verificação da atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* ATCC 25923 foram: 0,008; 0,01; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00. As concentrações finais (em %) dos óleos essenciais de canela, citronela, cravo-da-índia, orégano e compostos fenólicos citral e carvacrol para verificação da atividade antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* foram: 0,03; 0,07; 0,15; 0,31; 0,62; 1,25; 2,50; 5,00. Foram inoculados 10 µL de suspensão bacteriana, padronizada em 10⁷ UFC/mL, nas cavidades das microplacas, que foram tampadas e incubadas a 37 °C por 24 h, com posterior leitura visual para determinação da CIM, que correspondeu à menor concentração dos compostos que resultou em inibição completa do crescimento bacteriano, em comparação ao controle. Para a determinação da CBM, cada uma das suspensões da microplaca preparada para a determinação da CIM foi semeada em placas contendo TSA, incubadas a 37 °C por 24 h. Em todos os ensaios foram utilizados um controle negativo, caldo TSB acrescido de 0,5 % de Tween 80 e óleo essencial ou seus compostos isolados, e um controle positivo, caldo TSB acrescido de Tween 80 e inóculo bacteriano.

Determinação da redução logarítmica

Foi determinada a redução logarítmica obtida após tratamento com as soluções antimicrobianas, de acordo com Sharma e Anand²⁰, para cada tratamento empregado, por meio da seguinte equação $\text{Log } N - \text{Log } n$, em que N é a concentração inicial do inóculo bacteriano (neste estudo, 10⁷ UFC/mL) e n é a contagem de células após tratamento com os compostos antimicrobianos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

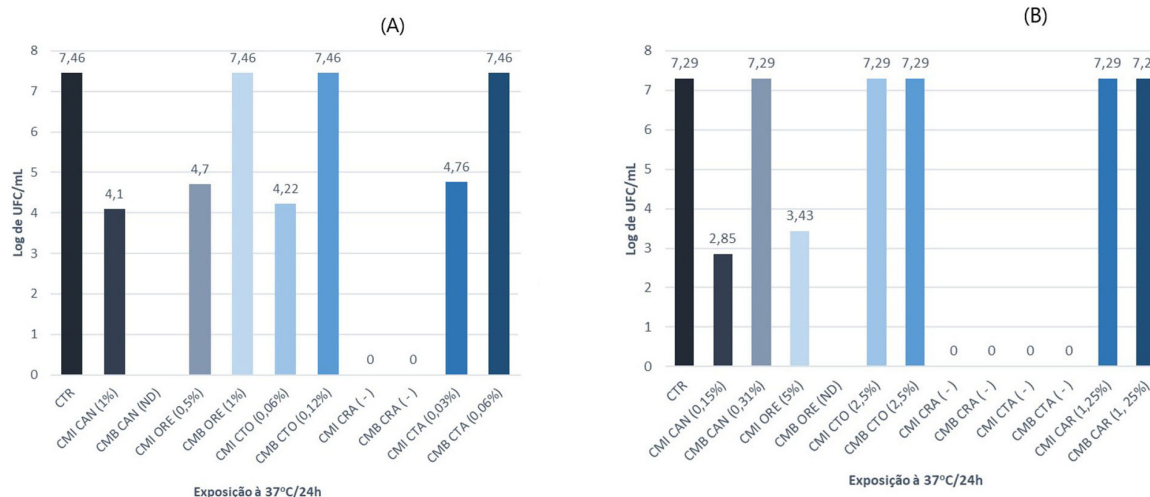
Os resultados obtidos para atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, canela, orégano, citronela e dos compostos isolados citral e carvacrol, expressos como CIM e CBM, estão dispostos na **Tabela** e os valores de redução logarítmica obtidos para *S. aureus* e *P. aeruginosa* estão expressos na **Figura**.

Os dados apresentados indicam que tanto *S. aureus* quanto *P. aeruginosa* apresentaram susceptibilidade a maior parte dos óleos essenciais e compostos isolados testados, sendo que organismos Gram-negativos são menos susceptíveis à ação de antibacterianos por apresentarem uma membrana externa envolvendo a parede celular²¹ que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipopolissacarídica²².

Tabela. Valores de CIM e CBM após a exposição de células de *S. aureus* ATCC 25923 e *P. aeruginosa* isolada de aspirado traqueal a diferentes concentrações de óleos essenciais e compostos citral e carvacrol

Compostos	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)
OE de canela	1	NO	0,15	0,31
OE de orégano	0,5	1	5	NO
OE de citronela	0,06	0,12	2,5	2,5
OE de cravo-da-índia	(-)	(-)	(-)	(-)
Citral	0,03	0,06	(-)	(-)
Carvacrol	NT	NT	1,25	1,25

*Nota: CIM = Concentração Inibitória Mínima; CBM = Concentração Bactericida Mínima; NO = não observado; (-) = ausência de atividade antimicrobiana; NT= não testado



Nota: CTR: controle positivo; CAN: canela; ORE: orégano; CTO: citronela; CRA: cravo-da-índia; CTA: citral; CAR: carvacrol; NO: não observado; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima.

Figura. Redução logarítmica observada após exposição a diferentes concentrações de óleos essenciais e compostos frente a (A) *S. aureus* ATCC 25923 e (B) *P. aeruginosa* isolada de aspirado traqueal

Entre os óleos essenciais avaliados, o de cravo-da-índia foi o único que não promoveu inibição no crescimento microbiano em nenhuma concentração avaliada, ao contrário do que foi observado por Abdullah et al²³, que ao testarem o óleo essencial de cravo-da-índia frente a seis diferentes micro-organismos por meio do método de difusão em ágar, verificaram atividade antimicrobiana para todos os micro-organismos avaliados em concentrações a partir de 0,625 % e de 1,25 % para *S. aureus* e para *P. aeruginosa*, respectivamente – e por Ates e Erdogru²⁴, que verificaram que o óleo essencial de cravo-da-índia promoveu inibição de uma gama de micro-organismos através do método de difusão em placa.

Para o óleo essencial de orégano, a CIM verificada foi de 0,50 % para *S. aureus*, em conformidade com estudos anteriores que evidenciaram valores aproximados de CIM para este óleo essencial entre 0,25 % e 1,00 %^{25,26}; para *P. aeruginosa*, o óleo essencial de orégano apresentou valor de CIM de 5 % e assim como Becerril et al²⁷, que encontraram resultados inibitórios deste óleo essencial contra *P. aeruginosa*, indica que este óleo essencial é um agente antimicrobiano eficiente mesmo em baixas concentrações.

O óleo essencial de canela apresentou CIM de 1 % e 0,15 % frente *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. Chaudhry e Tariq²⁸ testaram a atividade antimicrobiana de *C. cassia* contra 178 cepas de 12 gêneros bacterianos isolados de cavidade oral e evidenciaram efeitos inibitórios e bactericidas, ressaltando ainda que sua atividade antimicrobiana é devida ao composto majoritário cinamaldeído, além de componentes como eugenol, ácido cinâmico, diterpenos e proantocianidinas.

O citral, um dos principais componentes do óleo essencial de citronela, apresentou efeito inibitório e bactericida somente para *S. aureus*, nas concentrações 0,03 e 0,06 % respectivamente, enquanto que o óleo essencial de citronela apresentou os mesmos efeitos em concentrações duas vezes maiores, 0,06 e 0,12 %, respectivamente. Além do citral, outros compostos são encontrados no óleo essencial de citronela, como linalol, citronelal, citronelol, cis-citral, geraniol, trans-citral, acetato de geranila e β -cariofileno²⁹, sendo que o efeito antibacteriano do óleo essencial pode estar relacionado às altas quantidades de citronelal e limoneno³⁰. Diferentemente do composto citral, o óleo essencial de citronela apresentou atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, com CIM e CBM de 2,5 %; estes resultados evidenciam que outros compostos são responsáveis pela ação

antimicrobiana com possível sinergismo, uma interação positiva em que dois ou mais agentes em combinação exercem efeito inibitório maior que cada agente isolado³¹. Seixas et al³² testaram o óleo essencial de citronela sobre *Fusarium subglutinans* e constataram que o óleo essencial mostrou maior atividade em relação aos principais compostos isoladamente, ou seja, os compostos da citronela atuaram de forma conjunta proporcionando maior efeito antimicrobiano devido à atividade sinérgica entre os compostos. Vários outros estudos apontam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela e do citral contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*^{29,33,34}.

O composto carvacrol foi testado somente frente a *P. aeruginosa*, sendo que a concentração de 1,25 % foi considerada tanto inibitória quanto bactericida.

Quanto ao potencial para reduzir cargas microbianas presentes, a Figura evidencia que as concentrações bactericidas dos compostos citral e carvacrol para *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente, promoveram redução logarítmica comparável ao controle - 7,46 Log UFC/mL para *S. aureus* e 7,29 Log UFC/mL para *P. aeruginosa*.

Para os óleos essenciais, as concentrações bactericidas apresentaram redução logarítmica comparável ao controle, com exceção do OE de canela para *S. aureus* e do OE de orégano para *P. aeruginosa*, para os quais não foi observado o efeito bactericida, somente o efeito inibitório que permitiram redução de 4,1 Log UFC/mL e 3,4 Log UFC/mL, respectivamente.

Para *S. aureus*, as concentrações inibitórias dos óleos essenciais de canela, citronela e orégano promoveram reduções logarítmicas de 4,1 Log UFC/mL, 4,2 Log UFC/mL e 4,7 Log UFC/mL, respectivamente. Considerando que a presença de enterotoxinas estafilocócicas está associada a presença de 10⁵ a 10⁶ UFC de *S. aureus* por grama de alimento² e que a redução da população microbiana pode prevenir intoxicações de origem bacteriana no homem e, conseqüentemente a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos³⁵, a utilização de óleos essenciais ou compostos majoritários, como apresentado neste estudo, pode ser uma alternativa importante para prevenção da presença de enterotoxinas.

CONCLUSÃO

O estudo permitiu constatar a eficácia dos óleos essenciais de canela, orégano, citronela e dos compostos citral e carvacrol no controle de micro-organismos patogênicos de origens clínica e alimentar e verificar aqueles que apresentaram maior potencial antimicrobiano, como o óleo essencial de citronela e o composto citral frente a *S. aureus* e o óleo essencial de canela frente a *P. aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

1. Bachert C, Gevaert P, Van Cauwenberge P. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a key in airway disease? *Allergy*. 2002;57(6):480-7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1034/j.1398-9995.2002.02156.x>].
2. Borges MF, Nassu RT, Pereira JL, Andrade APC, Kuaye, AY. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Cienc Rural*. 2008;38(5):1431-8.
3. Appolinário RS. Absenteísmo na equipe de enfermagem: análise da produção científica. *R Enferm*. 2008;16(1):83-7.
4. Euzéby JP. LPSN. List of prokariotic names with standing in nomenclature. [acesso 2016 maio 29]. Disponível em: [<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>].
5. Tavares W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antifécciosos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
6. Koneman WE, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. Bacilos Gram-Negativos Não-Fermentadores. In: Koneman, E. W. Diagnóstico microbiológico - texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001;263-329.
7. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*. 2002;34(5):634-40. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1086/338782>].
8. McGowan JE Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S29-36. [DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.014>].

9. ECDC/EMEA. Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2009. [DOI: <http://dx.doi.org/10.2900/2518>].
10. World Health Organization - WHO. Antimicrobial resistance, fact sheet 194. [acesso 2016 Mai 23] Disponível em: [<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>].
11. Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc*. 2007;7:116–45.
12. Chorianopoulos NG, Giaouris ED, Skandamis PN, Haroutounian SA, Nychas GJ. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J Appl Microbiol*. 2008;104(6):1586–96. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.13652672.2007.03694.x>].
13. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(3):162–7. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x>].
14. De Martino L, De Feo V, Nazzaro F. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. *Molecules*. 2009;14(10):4213–30. [DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules14104213>].
15. Antunes MDC, Cavaco AM. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragr J*. 2010;25(5):351–366. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1986>].
16. Nedorostova L, Kloucek P, Kokoska L, Stolcova, M. Comparison of antimicrobial properties of essential oils in vapour and liquid phase against foodborne pathogens. *Planta Med*. 2008, 74:PI6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1084914>].
17. Guimarães LGL, Cardoso MG, Zacaroni LM, Lima RK, Pimental FA, Morais AR. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPP). *Quim Nova*. 2008;31(6):1476–80.
18. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol*. 2001;45(3):201–8. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x>].
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard — Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, Wayne, Pa, USA; 2003.
20. Sharma M, Anand SK. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, 2002;13(6-7):469–77. [DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8)].
21. Ratledge C, Wilkinson SG. An overview of microbial lipid. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds): *Microbial lipids*, Vol. 1 (pp 3– 22). London: Academic Press; 1988.
22. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev*. 1992;56(3):395–411.
23. Abdullah BH, Hatem SF, Jumaa W. A comparative study of the antibacterial activity of clove and rosemary essential oils on multidrug resistant bacteria. *UK J Pharm Biosci*. 2015;3(1):18–22. [DOI: <http://dx.doi.org/10.20510/ukjpb/3/i1/89220>].
24. Ates DA, Erdogrul OT. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turk J Biol*. 2003;27:157–62.
25. Santos JC, Carvalho Filho CD, Barros TF, Guimarães AG. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from oregano, garlic, clove and lemon against pathogenic bacteria isolated from *Anomalocardia brasiliensis*. *Semin: Ciênc Agrár*. 2011;32(4):1557–64. [DOI: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n4p1557>].
26. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol*. 1999;86(6):985–90. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>].
27. Becerril R, Nerín C, Gómez-Lus R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(8):699–705. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2011.1097>].

28. Chaudhry NMA, Tariq P. Anti-microbial activity of *Cinnamomum cassia* against diverse microbial flora with its nutritional and medicinal impacts. *Pak J Bot*. 2006;38(1):169-74.
29. Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (citronella grass). *JARC*. 2003;37(4):249-52. [DOI: <http://dx.doi.org/10.6090/jarq.37.249>].
30. Millezi AF, Baptista NN, Caixeta DS, Rossoni DF, Cardoso MG, Piccoli RH. Caracterização química e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev Bras Plantas Med*. 2014;16(1):18-24. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000100003>].
31. Cuenca-Estrella M. Combinations of antifungal agents in therapy - what value are they? *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(5):854-69. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh434>].
32. Seixas PTL, Castro HC, Santos GR, Cardoso DP. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(esp):523-6. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000500003>].
33. Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pestic Biochem Physiol*. 2010;98(1):89-93. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.05.004>].
34. Wei LS, Wee W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. *Iran J Microbiol*. 2013;5(2):147-52.
35. Lamaita HC, Cerqueira MMOP, Carmo LS, Santos DA, Penna CFAM, Souza MR. *Staphylococcus sp.* counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57(5):702-9. [DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000500017>].