

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CONTRA *SALMONELLA TYPHIMURIUM* E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AGAINST *SALMONELLA TYPHIMURIUM* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ana Lúcia Penteado¹

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Laboratório de Microbiologia Ambiental, Jaguariúna/SP, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-4537-1097>

analucia.penteado@embrapa.br

Raquel Andrade Eschionato²

raqueleschionato@gmail.com

Faculdade de Jaguariúna (FAJ), Departamento de Engenharia Ambiental, Jaguariúna/SP, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-0962-1474>

raqueleschionato@gmail.com

Débora Renata Cassoli de Souza³

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Central Analítica de Resíduos e Contaminantes, Jaguariúna/SP, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-5917-7869>

debora.cassoli@embrapa.br

Sonia Claudia Nascimento Queiroz⁴

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Central Analítica de Resíduos e Contaminantes, Jaguariúna/SP, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0002-1725-183X>

sonia.queiroz@embrapa.br

¹ Administração do projeto, Discussão dos resultados, Escrita, Revisão e aprovação da versão final do trabalho.

² Coleta de dados.

³ Coleta de dados, Discussão dos resultados, e aprovação da versão final do trabalho.

⁴ Discussão dos resultados, Participação na revisão e aprovação da versão final do trabalho.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes óleos essenciais e suas combinações contra linhagens patogênicas de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 e *Staphylococcus*

aureus ATCC 13565. Foram testados ao todo 41 óleos essenciais e as combinações em pares dos óleos de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e canela

(*Cinnamomum cassia* (L.) D.Don. para observar efeitos adicionais ou não na inibição dos microrganismos. Os resultados mostraram que as melhores atividades antimicrobianas para os dois microrganismos foram obtidas utilizando os óleos de *Thymus vulgaris* L. (tomilho), *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta). As combinações de cada par dos óleos de alecrim-pimenta, capim-limão, tomilho, orégano e canela não apresentaram uma melhora adicional no efeito para os patógenos estudados quando comparados com os seus óleos testados isoladamente. As composições químicas dos óleos essenciais mais ativos foram obtidas por meio de análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), sendo que os compostos majoritários do óleo de orégano foram carvacrol (69,1%) e *p*-cimeno (18,8%), do óleo essencial de tomilho foram timol (45,5%) e *p*-cimeno (35,6%) e do alecrim-pimenta foram o timol (77,2%) e *p*-cimeno (14,2%). Análises quantitativas de *p*-cimeno, carvacrol e timol nos três óleos foram realizadas e comparadas com as composições químicas mostrando resultados proporcionalmente coerentes, exceto para *p*-cimeno, que foi quantificado com menores porcentagens por esse método. A aplicabilidade dos óleos selecionados, ou das substâncias presentes isoladas seria diretamente nos alimentos, com a finalidade de inibir ou controlar o crescimento desses patógenos, contribuindo assim para a segurança dos alimentos.

Palavras chave: Bioensaio. CG-EM. Inibição. Carvacrol. Timol. *p*-cimeno

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of several essential oils and their combination against pathogenic strains of *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 and *Staphylococcus aureus* ATCC 13565. A total of 41 essential oils and the combinations in pairs of the oils of rosemary pepper (*Lippia sidoides* Cham.), lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.), thyme (*Thymus vulgaris* L.), origanum (*Origanum vulgare* L.) and cinnamon (*Cinnamomum cassia* (L.) D.Don) were tested to observe additional effects or not in the inhibition of

microorganisms. The results showed that the best antimicrobial activities for the two microorganisms were obtained using the oils of *Thymus vulgaris* L. (thyme), *Origanum vulgare* L. (origanum) and *Lippia sidoides* Cham. (rosemary pepper). The combinations of each pair of rosemary pepper, lemongrass, thyme, origanum and cinnamon oils did not show any further improvement in the effect for the studied pathogens when compared to their oils tested alone. The compositions of the most active essential oils were obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The major compounds in origanum oil were carvacrol (69.1%) and *p*-cymene (18.8%), thyme essential oil were thymol (45.5%) and *p*-cymene (35.6%) and rosemary pepper were thymol (77.2%) and *p*-cymene (14.2%). Quantitative analyses of *p*-cymene, carvacrol and thymol confirmed the presence in thyme, origanum and pepper rosemary oils and were compared with the chemical composition showing similar results, except for *p*-cymene, which was quantified with lower percentages in these oils.

One of the possible applications of the results of this work is the use of essential oils, or the isolated substances, directly in foods, with the purpose of inhibiting or controlling the growth of these pathogens, thus contributing to the food safety.

Keywords: Bioassay. GC-MS. Inhibition. Carvacrol. Thymol. *p*-cymene

INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que 600 milhões de pessoas adoecem depois de ingerirem alimentos contaminados em todo o mundo, e 420.000 pessoas morram de doenças transmitidas por alimentos a cada ano (Fernández et al., 2018). No Brasil, o patógeno mais prevalente encontrado em surtos de origem alimentar é a *Salmonella* spp., seguido pelo *Staphylococcus aureus*

(Lentz et al., 2018). Estes microrganismos são geralmente transmitidos aos seres humanos por meio do consumo de alimentos contaminados como carnes, aves, ovos, leite, cremes, tortas recheadas com cremes, queijos, dentre outros (WHO 2019a; Franco & Landgraf, 2003; Germano & Germano, 2011). Uma das formas de controle das doenças transmitidas por estes patógenos é o uso de antibióticos (Germano & Germano, 2011), mas em razão ao uso difundido e frequente de antimicrobianos sintéticos, um aumento da resistência microbiana a estes compostos tem sido observado. Isto tem levado a uma crescente necessidade de encontrar novos produtos com atividades antimicrobianas para substituírem os já existentes (Andrade et al., 2014).

Embora diversas novas drogas antimicrobianas venham sendo descobertas, suas eficiências têm diminuído principalmente em função à resistência de patógenos a esses compostos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) a resistência microbiana a antibióticos está entre as dez principais ameaças para a saúde em 2019 (WHO, 2019b). Além disso, os efeitos indesejáveis de muitas drogas (como alergias), aliados ao seu alto custo e aos problemas causados ao meio ambiente, têm sido motivos de grande preocupação (Vangay et al., 2015; Amsaleg & Laverman, 2016).

Em função disto, alternativas mais saudáveis e sustentáveis têm sido pesquisadas para substituírem os antimicrobianos sintéticos.

Assim, estão sendo cada vez mais estudadas substâncias bioativas derivadas de plantas, dentre estas as provenientes dos óleos essenciais (Yap et al., 2014).

Óleos essenciais são misturas de compostos voláteis, metabólitos secundários de plantas, compostos principalmente de mono e sesquiterpenos, ésteres de ácidos graxos, fenil propanonas, álcoois, aldeídos, cetonas, dentre outros (Stojkovic et al., 2013). Os óleos essenciais são encontrados nas folhas, flores, frutos, cascas, caules, raízes e sementes (Santos et al., 2017a). A atividade biológica do óleo essencial é diretamente dependente da sua composição química (Stojkovic et al., 2013), sendo esta influenciada pelo clima, estação do ano, condições geográficas, período de colheita, da técnica de extração, características do solo, dentre outras (Santos et al., 2012).

Diversos autores relataram que óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, aromáticas e condimentares apresentaram atividades antimicrobianas contra um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (Bernardos et al., 2014; Peng et al., 2014; Karaman et al., 2017; Santos et al., 2017a).

Desta forma, o uso de óleos essenciais, muitos deles reconhecidos como seguros pelo FDA (Food and Drug Administration) podem ser utilizados como conservantes naturais em alimentos, substituindo os sintéticos, por meio de sua incorporação em alimentos, proporcionando uma melhor proteção contra

microrganismos e/ou reduzindo o fenômeno de oxidação lipídica (Santos et al., 2017b).

Assim, em razão ao enorme potencial do uso de óleos essenciais como conservantes de alimentos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a dois patógenos de origem alimentar. A aplicação destes resultados pode ser no uso dos óleos essenciais diretamente nos alimentos, em substituição aos sintéticos, para consumo por animais ou seres humanos, a fim de controlar ou inibir a proliferação desses microrganismos.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas linhagens de *S. typhimurium* (ATCC 13311) e *S. aureus* (ATCC 13565), doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Rio de Janeiro. As culturas foram mantidas congeladas a -80°C até o dia do experimento.

Preparo do inóculo

Os microrganismos foram cultivados em ágar tripticase de soja (TSA), e incubados a 35°C . Os inóculos foram transferidos a TSA em períodos consecutivos de 24 horas imediatamente antes do seu uso no experimento. Células foram coletadas de TSA com auxílio de uma alça de platina e transferidas para solução salina (NaCl 0,85%) para ajustar a suspensão a uma concentração de 2×10^7 UFC/mL, de acordo com a escala

de turbidez MacFarland e com o auxílio do equipamento Densimat (bioMerieux). A solução bacteriana foi então diluída serialmente (1:10) em água peptonada (0,1%), e alíquotas de 1mL de cada diluição foram plaqueadas em meio TSA, pela técnica de plaqueamento em profundidade (Silva et al., 2017), seguida de incubação a $35^{\circ}\text{C}/24$ horas para determinar a concentração viável de células.

Teste de susceptibilidade para atividade antimicrobiana

Método de disco difusão em ágar (NCCLS/CLSI, 2003).

Com auxílio de zaragatoa esterilizada foram realizadas estrias na superfície de placas de meio Ágar Mueller-Hinton com uma suspensão do microrganismo teste de concentração 2×10^7 UFC/mL e então cuidadosamente com auxílio de uma pinça foram colocados discos (Marca Cecon) de diâmetro 6 mm, esterilizados sobre a superfície do meio. Foi realizada a aplicação de 10 μL de óleo essencial, em cada disco.

As placas foram então incubadas a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ e realizadas as leituras de formação de halos de inibição em milímetros. Foram realizadas duas repetições, em períodos distintos, para cada teste óleo/microrganismo. O controle positivo foi realizado com disco do antibiótico florfenicol (30 μg). O florfenicol é um antibiótico de uso veterinário e foi utilizado em razão ao estudo envolver bactérias com alto

potencial de contaminação em alimentos de origem animal.

Os resultados foram expressos como uma média de duas repetições. As leituras para observação das zonas de inibição tanto para os óleos analisados isoladamente como para avaliação do efeito adicional (ou não) dos melhores resultados, foram realizadas após 24 horas de incubação das placas a 35° C.

Como parâmetro para a atividade antibacteriana dos óleos essenciais, foram utilizados os padrões de sensibilidade adotados por Ponce et al. (2003), que

classificaram a atividade de diferentes óleos essenciais de acordo com o tamanho do halo de inibição, a saber: não sensível (-) para diâmetros ≤ 8 mm; sensível (+) para diâmetros de 9-14 mm; muito sensível: (++) para 15-19 mm; extremamente sensível: (+++) para os halos com diâmetro ≥ 20 mm.

Óleos essenciais avaliados

A tabela 1 mostra os óleos essenciais que foram adquiridos comercialmente.

Tabela 1 – Óleos essenciais adquiridos no comércio.

Óleo n°	Nome comum	Nome científico	Fornecedor
01	Arvore-do-chá	<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel	Quinari
02	Cedro	<i>Juniperus virginiana</i> L.	Quinari
03	Orégano	<i>Origanum vulgare</i> L.	Petite Marie
04	Junípero	<i>Juniperus communis</i> L.	Quinari
05	Camomila-azul	<i>Matricaria recutita</i> L.	Quinari
06	Gerânio	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér.	Quinari
07	Limão-siciliano	<i>Citrus limonum</i> Risso	Quinari
08	Eucalipto-citriodora	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.	Quinari
09	Eucalipto-globulus	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Quinari
10	Erva-doce	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Quinari
11	Vetiver	<i>Vetiveria zizanioides</i> Nash in Small	Quinari
12	Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	Quinari
13	Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> n Benth.	Quinari
14	Cipestre	<i>Cupressus sempervirens</i> L.	Quinari
15	Toranja	<i>Citrus paradisi</i> Macfad.	Quinari
16	Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Quinari
17	Sândalo-amyris	<i>Amyris balsamifera</i> L.	Quinari

18	Anis-estrelado	<i>Illicium verum</i> Hook.f	Laszlo
19	Canela	<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) D.Don	Quinari
20	Bergamota	<i>Citrus bergamia</i> Risso & Poit.	Laszlo
21	Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt	Laszlo
22	Alecrim-do-cerrado	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	Laszlo
23	Abeto -siberiano	<i>Abies sibirica</i> Ledeb.	Laszlo
24	Alecrim-pimenta	<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Laszlo
25	Alecrim-premium	<i>Rosarinus officinalis</i> L.	Laszlo
26	Cravo-botões	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry	Laszlo
27	Gengibre	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Laszlo
28	Olibano	<i>Boswellia carterii</i> Birdw.	Oshadi
29	Hortelã-verde	<i>Mentha spicata</i> L.	Laszlo
30	Canela-do-himalaia	<i>Cinnamomum glaucescens</i> (Nees) Hand.-Mazz.	Laszlo
31	Ravensara	<i>Ravensara aromatica</i> Sonn.	Laszlo
32	Jasmim-sambac	<i>Jasminum sambac</i> (L.)	Laszlo
33	Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> (L.)	Oshadi
34	Majericão-cravo	<i>Ocimum gratissimum</i> (L.)	Terra Flor

Fonte: Próprio autor, 2021

As frutas: laranja-pera, limão-siciliano, mexerica-murcote, laranja-bahia, laranja-lima, laranja-dekopon e limão-taiti, utilizadas neste experimento, foram adquiridas no comércio na cidade de Campinas-SP e seus óleos essenciais extraídos no laboratório. O método utilizado para as extrações dos óleos essenciais de plantas e/ou suas partes vegetais foi a hidrodestilação, utilizando-se para isso um aparelho tipo Clevenger (Abdellatif & Hassani, 2015; Umaru et al., 2019). O cálculo do rendimento foi realizado

considerando o volume do óleo essencial obtido e a massa fresca da planta.

Ao final da extração, aproximadamente 6 horas, coletaram-se os óleos essenciais extraídos, acondicionando-os separadamente em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados e limpos e então armazenados a -20°C. Os rendimentos dos óleos essenciais para cascas de laranja-pera foi de 1,3%, para limão-siciliano 0,4%, para mexerica-murcote 0,7%, laranja-bahia 0,6%, laranja-lima 0,6%, laranja-dekopon 0,5% e limão-taiti 1,0%. Os padrões de *p*-cimeno (99,0%), timol (98,0%) e

carvacrol (98,0%), usados na quantificação, foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os óleos essenciais que apresentaram os melhores resultados quanto aos testes de susceptibilidade para atividade microbiana foram caracterizados utilizando a técnica, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) (Daferera et al., 2000). Foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso (CG) Agilent, 7890B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), com uma coluna HP-5MS ultra inerte (30m x 0.25mm d.i., 0,25 µm poro), Agilent. O programa de temperatura do forno foi: 50°C (por 1 min), rampa de 3° C min⁻¹ até 230°C mantida por 20 min e finalmente outra rampa 30°C min⁻¹ até 300°C mantida por 10 min. Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min⁻¹. As amostras de óleo foram diluídas em n-hexano (1:1000) e injetadas 1 µL em modo *splitless* com temperatura do injetor de 220°C. O EM, acoplado ao CG Agilent, com fonte (T=280 °C) de ionização por elétrons (70eV), foi utilizado em modo “scan” (40-500 *m/z*). A temperatura da linha de transferência foi 300°C. Os índices de retenção foram calculados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos C7-C40, injetados nas mesmas condições das amostras. A identificação dos componentes do óleo foi baseada na comparação do índice de retenção (IR) com

os valores descritos por Adams (2009). Por meio do software “Agilent Mass Hunter Workstation Quantitative Analysis Unknowns Analysis” (versão 10.0-2016-2018), foram analisados os espectros de massa de cada pico do cromatograma e comparado com os espectros de massa da data base NIST17-*Mass Spectral Search Program* (versão 2.3, 2017). Foram selecionados os compostos majoritários identificados na composição química dos óleos essenciais de tomilho, orégano e alecrim-pimenta, para quantificação de *p*-cimeno, carvacrol e timol por meio de padronização externa. Na quantificação, o EM foi operado em modo SIM (selected ion monitoring) usando os ions *m/z* 119, *m/z* 135, *m/z* 135 como ions *quantifier* e dois ions *qualifier* para confirmação de cada composto: ions *m/z* 91 e *m/z* 134, *m/z* 115 e *m/z* 150, *m/z* 115 e *m/z* 150 para *p*-cimeno, carvacrol e timol, respectivamente. Foram preparadas soluções estoques de 1000 µg/mL em acetona para cada composto. Para obter as curvas analíticas foram preparadas soluções com concentrações de 1,25 a 100,0µg/mL em acetona com a mistura dos três compostos. Os óleos foram pesados para o preparo de soluções de 1000,0µg/mL em acetona e diluídos para a concentração de 25,0µg/mL. Essas soluções foram utilizadas na quantificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565

A tabela 2 mostra os valores obtidos para a atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra *S. Aureus* ATCC 13565. Observa-se que o microrganismo não apresentou sensibilidade para dezessete óleos, com tamanho de halo de inibição menor ou igual a 8,0 mm. Para três óleos o microrganismo se mostrou muito sensível e para seis óleos ele foi extremamente sensível com halos maiores ou iguais a 20,0 mm. Os óleos essenciais que apresentaram os melhores valores foram, *T. vulgaris* L. (tomilho), *O. vulgaris* L. (orégano), e *L. Sidoides* Cham. (alecrim-pimenta), com tamanho de halos superiores a 45,0 mm.

Cinco óleos, tomilho, orégano, alecrim-pimenta, capim-limão e canela, apresentaram valores de halos de inibição superiores ao valor obtido para o controle positivo florfenicol que foi de $31,5 \pm 0,70$.

Neste estudo o tamanho de halo de inibição encontrado para *S. Aureus* ATCC 13565 foi de 52,0 mm quando se utilizou o óleo essencial de tomilho. Borugã et al. (2014); Melo et al. (2015) e Semeniuc et al. (2017) estudaram a atividade antimicrobiana deste óleo contra *S. aureus* e encontraram valores de halos de inibição de 12,0 a 64,8 mm. A diferença nos valores de inibição deste estudo com o de outros autores talvez possa ser em função às diferentes porcentagens de constituintes individuais como o timol, γ -terpineno, *p*-cimeno encontrados no óleo essencial, bem como as diferentes quantidades de óleo aplicadas nos discos teste.

Oliveira et al. (2006) e Castro et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidoides* (alecrim-pimenta) contra *Staphylococcus aureus* e relataram que discos impregnados com óleo essencial puro ou diluído desta planta, apresentaram halos de inibição de 15,0 a 26,0 mm, valores bem inferiores ao tamanho de halo de 46,0 mm obtido neste trabalho. Isto pode ser em razão das diferentes quantidades dos principais componentes (timol e *p*-cimeno) presentes nos óleos testados neste estudo, bem como o uso de diferentes linhagens do microrganismo. Outros estudos encontraram como principais constituintes do óleo essencial de *L. sidoides* (timol e carvacrol) com forte atividade antimicrobiana (Botelho et al. 2007; Carvalho et al. 2013).

Sivropoulou et. al. (1996); Souza et al. (2006) e Melo et al. (2015) estudaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial de orégano e relataram halos de inibição com tamanhos entre 17,0 a 39,6 mm, valores estes inferiores ao encontrado neste trabalho, que foi de 47,0 mm. As quantidades de carvacrol (69,1%) e timol (3,9%) neste trabalho, conforme mostra a tabela 4, foram semelhantes aos obtidos por Sivropoulou et al. (1996), de respectivamente 79,58% e 2,45% para carvacrol e timol. A maior diferença foi para o *p*-cimeno, com um valor de 18,8% neste estudo aproximadamente quase duas vezes o valor encontrado por Sivropoulou et al. (1996) de 8,76%.

Os diferentes valores de tamanho de halos encontrados nos trabalhos podem ser dado que as diferentes composições químicas dos óleos essenciais testados, que variam conforme o clima, estação, condições geográficas, período de colheita, parte da planta utilizada para extração, tipo de solo, fertilização, tipo de linhagem bacteriana utilizada e técnica de obtenção do óleo, a

mesma observação foi realizada por Melo et al. (2015) e Ebani et al. (2016). Além disso, óleos essenciais podem ter um grau variável de penetração no ágar e volatilização, o qual podem alterar o tamanho do halo de inibição e conseqüentemente reduzir o efeito antimicrobiano (Lopez et al., 2007).

Tabela 2 - Média do halo de inibição de *S. aureus* ATCC 13565 e *S. typhimurium* ATCC 13311 versus óleos essenciais

Óleo	Tamanho do halo (mm)/Sensibilidade**			
	<i>S. aureus</i> ATCC 13565 (DP*)		<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311 (DP*)	
Arvore-do-chá	10,0 ±0,0	+	22,0±0,0	+++
Cedro	14,0±1,4	+	≤ 8,0	-
Orégano	47,0±4,9	+++	42,0±0,0	+++
Junipero	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Camomila-azul	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Gerânio	12,0±0,0	+	11,0±0,0	+
Limão-siciliano	≤ 8,0	-	10,0±0,0	+
Eucalipto-citriodora	≤ 8,0	-	15,0±0,0	++
Eucalipto-globulus	9,0±0,0	+	14,0±0,0	+
Erva-doce	9,0±0,0	+	≤ 8,0	-
Vetiver	13,0±0,0	+	≤ 8,0	-
Capim-limão	35,0±0,0	+++	29,0±0,8	+++
Patchouli	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Cipestre	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Grapefruit	14,0±0,0	+	14,0±0,0	+
Tomilho	52,0±0,6	+++	55,0±0,0	+++
Sândalo-amyris	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Anis-estrelado	≤ 8,0	-	10,0±0,0	+
Canela	40,0±0,6	+++	31,0±0,0	+++
Bergamota	11,0±0,0	+	11,0±0,0	+
Citronela	16,0±0,4	++	13,0±0,0	+
Alecrim-do-cerrado	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Abeto-siberiano	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Alecrim-pimenta	46,0±0,0	+++	51,0±0,5	+++
Alecrim-premium	12,0±0,0	+	12,0±0,0	+
Cravo-botões	19,0±0,0	++	22,0±0,0	+++
Gengibre	10,0±0,0	+	≤ 8,0	-
Olibano	18,0±0,0	++	≤ 8,0	-
Hortelã-verde	20,0±0,0	+++	17,0±0,0	++
Canela-do-himalaia	11,0±0,0	+	15,0±0,0	++
Ravensara	≤ 8,0	-	10,0±0,0	+
Jasmim-sambac	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Coentro	≤ 8,0	-	21,0±0,4	+++
Abeto-siberiano	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Manjeriçao-cravo	13±0,0	+	26,0±0,6	+++
Casca de laranja-perã	≤ 8,0	-	12,0±0,0	+

Casca de imão-siciliano	11±0,0	+	17,0±0,0	++
Casca de mexirica-murcote	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-
Casca de laranja-bahia	10±0,0	+	11,0±0,0	+
Casca de limão-taiti	11±0,0	+	14,0±0,0	+
Casca de laranja-dekopon	≤ 8,0	-	9,0±0,0	+
Casca de laranja-lima	≤ 8,0	-	≤ 8,0	-

*DP= desvio padrão

** Ponce et al., 2003

Fonte: Próprio autor, 2021

Os óleos selecionados para efeito das misturas foram o que apresentaram melhor atividade. Assim foram preparadas misturas na proporção de 50% v/v de cada óleo, (tabela 1) e realizados os testes os quais demonstraram uma diminuição do tamanho do halo para todas as misturas testadas quando comparados com os valores dos

óleos isolados conforme mostrado na tabela 3. Resultados semelhantes foram relatados por Semeniuc et al. (2017), que quando realizaram a mistura de diferentes óleos essenciais com o tomilho observaram um efeito não adicional na inibição de *S. aureus* comparado com o óleo puro de tomilho.

Tabela 3 - Efeito nas misturas de óleos essenciais contra *S. aureus* ATCC 13565

Óleos	Tamanho halo (mm) / *DP	Sensibilidade
Alecrim-pimenta + capim-limão	26,0 ± 0,0	+++
Alecrim-pimenta + tomilho	37,0 ± 0,0	+++
Alecrim-pimenta +orégano	34,0 ± 0,0	+++
Alecrim-pimenta + canela	24,0± 1,4	+++
Tomilho + capim-limão	24,0 ± 0,0	+++
Tomilho + orégano	42,0 ± 1,4	+++
Tomilho + canela	28,0 ± 0,0	+++
Orégano + canela	30,0 ± 0,0	+++
Orégano + capim-limão	23,0 ± 0,0	+++
Capim-limão + canela	35,0 ± 0,0	+++

*DP= desvio padrão

Fonte: Próprio autor, 2021

Atividade antimicrobiana de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

A tabela 2 mostra os valores obtidos para a atividade antimicrobiana de óleos essenciais comerciais versus *S. Typhimurium* ATCC

13311. De acordo com esses resultados observa-se que 28 óleos essenciais tiveram tamanho de halos de inibição com valores menores ou iguais a 14,0 mm, indicando pouca ou nenhuma atividade para *S. Typhimurium* ATCC 13311, que foi extremamente sensível para nove óleos essenciais com valores de halo de inibição maiores que 20,0 mm. Os óleos essenciais que apresentaram melhores valores foram, respectivamente, de *Thymus vulgaris* L.(tomilho), *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) e *Origanum vulgare* L. (orégano). O antibiótico florfenicol apresentou um valor de halo de inibição de $38 \pm 1,4$, valor este inferior ao tamanho de halo obtido para os resultados dos melhores óleos com atividade contra *S. Typhimurium* ATCC 13311, anteriormente citados.

Borugã et al. (2014); Mazzarrino et al.(2015) e Semeniuc et al. (2017), estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho frente a diferentes microrganismos. Os autores relataram um tamanho de halo de 10,5 mm a 27,44 mm para inibição de *S. typhimurium*. Já Melo et al. (2015) obtiveram um valor de halo de 62,4 mm, valor superior a 55,0 mm obtido neste trabalho. Conforme relatado por Alves (2010), o elevado potencial antimicrobiano apresentado por este óleo é atribuído às substâncias timol, carvacrol, *p*-cimeno e γ -terpineno, que foram os componentes com maiores porcentagens no presente trabalho.

Teixeira et al. (2013); Melo et al. (2015) e Ebani et al. (2016), estudaram a bioatividade de óleo de orégano (*Origanum vulgare*) e encontraram halos de inibição com valores de 15,3 a 50,9 mm quando testados contra *S. typhimurium*. No presente trabalho foi obtido um halo de 42,0 mm, valor este menor que o tamanho de halo obtido no trabalho de Melo et al. (2015). Talvez esta diferença de tamanho de halo seja devida às diferentes composições químicas do óleo essencial de orégano, a qual influencia na sua atividade antimicrobiana, conforme relatado por Sivropoulou et al. (1996).

Além da composição química, outro fator preponderante que tange a atividade antimicrobiana de um determinado óleo essencial é a concentração de células do microrganismo presentes no meio em ensaio (Alves, 2010). A maioria dos artigos publicados nesta área diverge em valores de concentração mínima inibitória, pois há grande variação UFCs do microrganismo em questão presentes nos meios utilizados nos ensaios, o que dificulta a comparação de resultados (Alves, 2010). Conforme Mazzarrino et al. (2015) o método de disco difusão pode ser considerado uma importante ferramenta para distinguir a atividade antimicrobiana entre diferentes óleos essenciais, embora a viscosidade do óleo, bem como sua natureza apolar, possam dificultar a difusão, resultando numa subestimação da sua atividade.

O potencial de aplicação desses óleos no controle dos patógenos estudados é enorme. Um dos possíveis usos dos óleos e/ou componentes isolados, que apresentaram melhores atividades, é a confecção de embalagens bioativas. Além disso, por estes óleos essenciais serem de origem alimentar, podem ser utilizados diretamente nos alimentos para consumo animal ou humano, a fim de controlar ou inibir a proliferação desses microrganismos.

Na tabela 4 observa-se que o uso conjunto de óleos essenciais apresentou um efeito antagônico na inibição de *S. Typhimurium* ATCC 13311. O resultado é diferente do demonstrado por Stojkovic et al. (2013), no qual os autores observaram que houve um

efeito antimicrobiano adicional quando houve a combinação de óleo essencial de tomilho com o óleo essencial de orégano contra *S. typhimurium*. Os mesmos autores mencionaram que resultados de diferentes estudos são difíceis de comparar, muito provavelmente por causa dos diferentes testes, linhagens bacterianas e fontes de antimicrobianos utilizados. Ebani et al. (2016), observaram que para uma cultura de *S. typhimurium* a mistura de orégano mais tomilho produziu um halo de inibição de valor 13,3 mm, valor este inferior que o obtido pelos autores para o óleo essencial isolado de orégano (15,3 mm), porém superior ao tomilho isolado (9,0 mm).

Tabela 4. Efeito na atividade de misturas de óleos essenciais contra *S. Typhimurium* ATCC 13311

Óleos	Tamanho halo (mm) / DP*	Sensibilidade
Orégano + Tomilho	46,0 ± 1,4	+++
Alecrim-pimenta + Orégano	42,0 ± 0,0	+++
Tomilho + Alecrim-pimenta	50,0 ± 0,0	+++

DP*= desvio padrão

Fonte: Próprio autor, 2021

Foram realizadas as caracterizações por CG-EM dos óleos essenciais que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana, são eles o de tomilho, orégano e alecrim-pimenta.

Caracterização e composição química dos óleos essenciais

Os resultados das análises dos óleos essenciais de tomilho, orégano e alecrim-pimenta (tabela 5), apresentaram como compostos majoritários para o óleo essencial

de orégano o carvacrol (69,1%) e *p*-cimeno (18,8%), do tomilho o timol (45,5%) e *p*-

cimeno (35,6%) e do alecrim-pimenta o timol (77,2%) e o *p*-cimeno (14,2%).

Tabela 5 - Composição química do óleo essencial de orégano, tomilho e alecrim-pimenta.

N°	t _{ret} (min)	Composto	IR _{exp} (A %)	IR _{exp} (A %)	IR _{exp} (A %)	IR _{lit}
			Orégano	Tomilho	Alecrim-pimenta	
01	11,7	α -pineno	934 (1,3)	932 (3,0)	934 (0,4)	932
02	14,1	Mirceno	991 (0,9)	991 (1,1)	991 (1,5)	998
03	15,7	<i>p</i> -cimeno	1026 (18,8)	1025 (35,6)	1025 (14,2)	1020
04	17,2	γ -terpineno	1060 (3,1)	1060 (3,2)	-	1054
05	19,1	linalol	1100 (2,0)	1100 (3,6)	1100 (0,2)	1098
06	25,2	Timolmetilletter	-	-	1236 (1,1)	1232
07	25,9	Timoquinona	-	1252 (0,6)	1252 (0,6)	1248
08	27,7	Timol	1292 (3,9)	1292 (45,5)	1293 (77,2)	1289
09	28,1	Carvacrol	1305 (69,1)	1302 (5,2)	1301 (0,4)	1298
10	33,3	Cariofilleno	1425 (0,1)	1425 (0,5)	1425 (3,4)	1417
11	39,7	Cariofilleno óxido	1589 (0,8)	1589 (0,3)	1589 (0,8)	1582

t_{ret}: tempo de retenção; IR_{exp}, Índice de retenção determinado utilizando uma série de n-alcanos C7-C40, IR_{lit}- Índice de de retenção da literatura (Adams, 2009). Coluna capilar HP5-MSUi (30mx0,25mm d.i., 0.25 μ m). A%: porcentagem de área considerando 100% dos picos identificados.

Fonte: Próprio autor, 2021

O óleo essencial de orégano evidenciou altas porcentagens de carvacrol (69,1%) e *p*-cimeno (18,8%). Conforme descrito por Ebani et al. (2016), o carvacrol foi um dos componentes majoritários no orégano, sendo que na análise realizada por eles, esse composto foi detectado com 65,9% e o *p*-cimeno com 9,3%. Stojkovic et al. (2013), encontraram 10,9% de *p*-cimeno e de carvacrol 64,5%.

O alecrim-pimenta e o tomilho denotaram, maiores quantidades de timol (45,5% e

77,2%) seguido de *p*-cimeno (35,6% e 14,2%), respectivamente. Teores dessas substâncias foram encontrados por Vasquez et al. (2018), que obtiveram 53,5% de Timol e 13,3% de *p*-cimeno para o alecrim-pimenta. Segundo Majolo et al. (2017), os teores de timol e *p*-cimeno foram 76,6% e 6,3% para alecrim-pimenta, respectivamente. Conforme descrito por Ebani et al. (2016), os teores encontrados no óleo essencial de tomilho foram 52,6% de timol e *p*-cimeno 15,3%.



Resultados da quantificação *p*-cimeno, timol e carvacrol

Durante a quantificação de *p*-cimeno, timol e carvacrol, a faixa linear de concentração dos compostos variou de 1,25 a 25,0µg/mL para o *p*-cimeno, 2,5 a 100,0µg/mL para timol e carvacrol com no mínimo 5 níveis de

concentração para construção das curvas de calibração O coeficiente de determinação foi aceitável ($r^2 > 0,99$). O limite de detecção (LD) foi considerado o primeiro ponto da curva com garantia de no mínimo 3x sinal/ruído.

Tabela 6 - Análise quantitativa de timol, carvacrol e *p*-cimeno nos óleos essenciais de tomilho, orégano e alecrim -pimenta.

Substância	Tempo de retenção (min)	Porcentagem em massa (%)		
		tomilho pimenta	orégano	alecrim-
<i>p</i> -Cimeno	15,7	13,0	7,0	6,0
Timol	27,7	34,0	21,0	61,0
Carvacrol	28,1	11,0	52,0	ND

ND=não detectado

Fonte: Próprio autor, 2021

Os tempos de retenção dos compostos *p*-cimeno, timol e carvacrol foram confirmados durante a quantificação dos compostos presentes nos óleos essenciais analisados. Os valores encontrados na quantificação estão coerentes em termos de proporção quando comparados aos das análises da composição química, utilizando % de áreas, exceto para timol, no óleo de orégano que mostrou um resultado maior do que na composição química (21,0%) e o *p*-cimeno (13,7 e 6,0% para tomilho, orégano e alecrim-pimenta, respectivamente) que mostraram menores porcentagens em massa pelo método de quantificação por padronização externa. Isso demonstra, que a comparação

das porcentagens em massa entre os diversos trabalhos publicados deve ser realizada utilizando a mesma metodologia de quantificação.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L. e *Lippia sidoides* Cham. apresentaram as melhores atividades inibitórias para ambos os microrganismos testados.

O estudo comprova o potencial uso destes óleos essenciais contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entretanto é necessário caracterizar e quantificar os

compostos, dado que a composição dos óleos essenciais pode mudar dependendo das condições experimentais utilizadas.

As combinações dos melhores resultados dos óleos essenciais apresentaram um efeito não adicional na inibição, quando testado para *S. aureus* ATCC 13565e *S. Typhimurium* ATCC 13311.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao "Projeto BRS Aqua (11.17.02.001.03.08), parceria celebrada entre o BNDES e Embrapa, com aporte de recursos do BNDES, SAP/MAPA e Embrapa.

REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, F., & HASSANI, A. Chemical composition of the essential oils from leaves of *Melissa officinalis* extracted by hydrodistillation, steam distillation, organic solvent and microwave hydrodistillation. **J Mater Environ Sci**, 2015;6(1):207-213. Disponível em: http://www.jmaterenvironsci.com/Document/vol6/vol6_N1/25-JMES-1032-2014_Abdellatif.pdf . Acesso em: 08 de abr., 2020.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4rd ed., Illinois, USA: Allured Business Media, 2009.

ALVES, R.S. (2010). **Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados por alimentos**. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

AMSALEG, C.R., & LAVERMAN, A.M. Do antibiotics have environmental side-effects? Impact of synthetic antibiotics on biogeochemical processes. **Environ Sci Pollut Res**. 2016;23(5):4000-4012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4943-3>

Andrade, V.A. et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesq. Vet. Bras**. 2014;34(12):1153-1161. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014001200002>

BERNARDOS, A. et al. Antifungal effect of essential oil components against *Aspergillus niger* when loaded into silica mesoporous supports. **J. Sci. Food Agric**. 2014;95(14):2824-2831. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7022>.

BORUGÃ, O. et al. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. **J Med Life**. 2014;7(3):56-60. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PM>

C4391421/pdf/SIJMedLife-07-56.pdf Acesso em 08 abr 2020

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J. Med. Biol. Res.** 2007;40(3):349-356. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2007000300010>

CASTRO, C.E. et al. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu**, 2011;13(3):293-297. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722011000300007>.

CARVALHO, R.R.C. et al. *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Quim Nova.** 2013;36(2):241-244. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200007>

DAFERERA D. J; ZIOGAS ,B. N, AND POLISSIOU M. G. GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum* **J Agric Food Chem.** 2000;48(6):2576–2581. <https://doi.org/10.1021/jf990835x>

EBANI, V.V. et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils against some pathogenic bacteria and yeasts shed from poultry. **Flavour Fragr J.** 2016;31(4):302-309. <https://doi.org/10.1002/ffj.3318>

FERNÁNDEZ, Y.A. et al. Antibacterial, preservative, and mutagenic potential of *Copaifera* spp. oleoresins against causative agents of foodborne diseases. **Foodborne Pathog Dis.** 2018;15 (12). <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2478>

Franco, B. D. G. M., & Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos.** 1. ed.,182p. São Paulo: Atheneu, 2003.

Germano, P.M.L. & Germano, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** 4. ed, 631p. São Paulo, Ed. Varela, 2011.

KARAMAN, M. et al. *Origanum vulgare* essential oil affects pathogens causing vaginal infections. **J. Appl. Microbiol.** 2017;122(5):1177-1185. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13413>

LENTZ, S.A.M.; et al. *Bacillus cereus* as the main casual agent of foodborne outbreaks in Southern Brazil: data from 11 years. **Cad Saúde Pública.** 2018;34(4):1-9. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00057417>

LOPEZ, P. et al. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme, an oregano essential oils

and key constituents against foodborne microorganisms. **J Agric Food Chem.** 2007;55(11):4348-4356.

<https://doi.org/10.1021/jf063295u>

MAJOLO, C. et al. Chemical composition of *Lippia* spp. essential oil and antimicrobial activity against *Aeromonas hydrophila*.

Aquac. Res. 2017;48(5):2380-2387.

<https://doi.org/10.1111/are.13073>

MAZZARRINO, G. et al. *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. **Food Control** 2015;50:794-803.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.029>

MELO, A.D.B. et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. **Can. J. Vet. Res.** 2015;79(4):285-289. Disponível em:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4581672/pdf/cjvr_10_285.pdf Acesso em 08 abr, 2020

NCCLS/CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.** Document M2-A8 - approved standard. Wayne:EUA; 2003.

OLIVEIRA, F.P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material.

Rev Bras Farmacogn. 2006;16(4):510-516.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000400013>

PENG, C. et al. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. **Food Chem.**

2014;165(15): 560-568, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.126>

PONCE, A.G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensm Wiss Technol.** 2003;36(7):679-684.

[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)

SANTOS, V. M. C. S. et al. Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. **Rev. Bras. Pl. Med.** 2012;14(1):97-102.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000100014>.

SANTOS, C.H.S.; PICCOLI, R.H.; TEBALDI, V.M.R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e

alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** 2017a;76:e1719:1-8. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial76_completa/artigos-separados/1719.pdf. Acesso: em 13 jan. de 2020.

SANTOS, R.R. et al. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. **Trends Food Sci Technol.** 2017b;61: 132-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.021>

SEMENIUC, C.A.; POP, C.R.; ROTAR, A.M. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **J. Food Drug Anal.** 2017; 25(2):403-408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.06.002>.

Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A.; Taniwaki, M.H.; Gomes, R.A.R.; Okazaki, M.M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**, 5ª ed. São Paulo, SP: Blucher, 2017.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **J. Agric. Food Chem.** 1996; 44(5):1202-1205,. <https://doi.org/10.1021/jf950540t>

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L.

(Lamiaceae) essential oil. **Braz. J. Microbiol.** 2006;37(4):527-532. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400023>

STOJKOVIC, D. et al. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. **Arch biol sci**, Belgrade. 2013;65(2):639-643. <https://doi.org/10.2298/ABS1302639S>

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **J. Sci. Food Agric.** 2013; 93(11):2707-2714. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>

UMARU, I.J.; BADRUDDIN, F. A.; UMARU, H. A. Phytochemical screening of essential oils and antibacterial activity and antioxidant properties of *Barringtonia asiatica* (L) leaf extract. **Biochem. Res. Int.** 2019, 1-6, 2019 <https://doi.org/10.1155/2019/7143989>

VANGAY, P. et al. Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease. **Cell Host Microbe.** 2015;17(5):553-564, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.006>

VASQUEZ, S, D. et al. Single and binary applications of essential oils effectively control *Listeria monocytogenes* biofilms. **Ind Crop Prod.** 2018;121(1):452-460. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.045>

World Health Organization-WHO. (2019a).

Salmonella. Disponível em:
https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/salmonella/en/ Acesso em 14 fev de 2019

World Health Organization-WHO (2019b).

Ten threats to global health in 2019.

Disponível em:
<https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em 05 de janeiro de 2019.

YAP, P.S.X. et al. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance.

Open Microbiol J. 2014;8:6-14.
<https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>