

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE DISTINTOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba*
(Mill).N.E.Brown

Fernanda Formolo

Caxias do Sul

2009

Fernanda Formolo

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
DISTINTOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* (Mill).N.E.Brown

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora Profa.Dra. Ana Paula Longaray Delamare

Co-orientador Prof. Dr. Gabriel Fernandes Pauletti

Caxias do Sul

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o êxito deste trabalho, especialmente:

- A Dr. Ana Paula Longaray Delamare, pela excelente orientação, apoio, confiança e amizade.
- Ao Dr. Gabriel Fernandes Pauletti, pela orientação e acompanhamento.
- Ao Dr. Sérgio Echeverrigaray, pela constante orientação e acompanhamento do trabalho.
- A Dr. Adriana Escalona Gower, pela orientação e acompanhamento.
- A aluna do curso de engenharia de alimentos e minha orientada Carolina Maria de Oliveira Nunes, pela amizade e por todo o trabalho, empenho e dedicação prestados a este trabalho.
- A todos os meus colegas de laboratório pela amizade e companheirismo.
- Aos professores, funcionários e colegas do curso de mestrado do Instituto de Biotecnologia.
- A minha família, por todo o apoio concedido em mais esta etapa de meu crescimento pessoal e profissional.
- E a Deus por ter me concedido a vida e a oportunidade de ter chegado até aqui.

ÍNDICE

Lista de tabelas	VI
Lista de quadros	VII
Lista de figuras	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Óleos essenciais e atividade antimicrobiana de plantas.	3
2.2 <i>Lippia sp</i> : Descrição, propriedades farmacológicas e composição química.	10
3. MATERIAL E MÉTODO	16
3.1. Linhagens Bacterianas.	16
3.2. Óleos essenciais de <i>Lippia alba</i> .	17
3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da dose inibitória 50 (DI50).	18
3.4. Teste de viabilidade versus tempo – Atividade microcida.	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Composição química dos óleos essenciais da espécie <i>Lippia alba</i> .	21
4.2 Inibição do crescimento microbiano do óleo essencial de sete quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .	26
4.3. Avaliação da viabilidade microbiana na presença de óleos essenciais dos sete quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .	40
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Dose de inibição dos sete acessos de <i>Lippia alba</i> (mg/mL) capazes de inibir em 50% o crescimento de leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.	30
Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos sete quimiotipos de <i>Lippia alba</i> (mg/mL) sobre leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.	34

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1	
Linhagens microbianas utilizadas nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Lippia alba</i> .	16
Quadro 2	
Origem, denominação e composição química dos sete acessos de <i>Lippia alba</i> coletados na região Sul do Brasil.	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Mapa demonstrando a origem geográfica da coleta inicial dos sete acessos de <i>Lippia alba</i> utilizados neste estudo.
	22
Figura 2	Dose de inibição dos sete acessos de <i>Lippia alba</i> (mg/mL) capazes de inibir em 50% o crescimento de leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.
	28
Figura 3	Concentração inibitória mínima dos sete quimiotipos de <i>Lippia alba</i> sobre leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.
	32
Figura 4	Inibição do crescimento de leveduras pelos sete quimiotipos de óleos essenciais da espécie <i>Lippia alba</i> .
	36
Figura 5	Inibição do crescimento de bactérias Gram positivas pelos sete quimiotipos de óleos essenciais da espécie <i>Lippia alba</i> .
	38
Figura 6	Inibição do crescimento de bactérias Gram negativas pelos sete quimiotipos de óleos essenciais da espécie <i>Lippia alba</i> .
	39
Figura 7.	Redução de viabilidade (log) de leveduras na presença de óleo de sete quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .
	41
Figura 8.	Redução de viabilidade (log) de bactérias Gram positivas na presença de óleo de sete quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .
	43

Figura 9. Redução de viabilidade (log) de bactérias Gram negativas na presença de óleo de sete quimiotipos de *Lippia alba*.

44

RESUMO

Lippia alba é uma espécie nativa, conhecida como “erva cidreira”, utilizada na medicina popular para o tratamento de distintas afecções. Estudos farmacológicos atribuem a sua atividade antimicrobiana aos terpenóides presentes no óleo essencial. Considerando a variação na composição de óleos essenciais de *L. alba*, o presente trabalho teve por objetivo determinar a composição química do óleo essencial de sete acessos de *L. alba* coletados no sul do Brasil, e avaliar a atividade antimicrobiana dos mesmos sobre um painel de 22 espécies bacterianas e 9 espécies de leveduras. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e analisados por Cromatografia gasosa e Cromatografia gasosa acoplada a um detector seletivo de massas. A atividade antimicrobiana (Dose de inibição 50% e Concentração inibitória mínima) foi determinada através do método de diluição seriada (0 a 10 mg/ml) em microplacas, com avaliação do crescimento por absorbância a 595nm. Para a determinação de Dose de inibição 50% e Concentração inibitória mínima foram consideradas as concentrações de óleo essencial que reduziram o crescimento em 50% e 90%, respectivamente. A atividade bactericida e bacteriostática foi determinada após 3h de tratamento dos microrganismos com a Concentração inibitória mínima pré-determinada para cada óleo. Com base nos seus componentes majoritários, os resultados permitiram caracterizar os sete acessos de *L. alba* como pertencentes aos quimiotipos: citral, 1,8-cineol/cânfora, linalol, linalol/mirceno/cânfora, carvona/cariofileno, linalol/1,8-cineol/germacreno D, e limoneno. Entre os quimiotipos, o óleo essencial “citral” exibiu o espectro antimicrobiano mais amplo, inibindo tanto bactérias como leveduras. Óleos com alta concentração de carvona/cariofileno e limoneno foram particularmente eficientes sobre leveduras, enquanto os quimiotipos linalol e linalol/1,8-cineol/germacreno D exibiram atividade inibitória sobre várias bactérias Gram positivas e negativas. Na Concentração inibitória mínima, o quimiotipo citral mostrou ação bactericida sobre leveduras e *Salmonella sp.* Entretanto, outros óleos apresentaram apenas efeito bacteriostático sobre a maioria dos microrganismos avaliados. Em geral, nossos resultados confirmam a atividade dos óleos essenciais de *L. alba* sobre microrganismos de importância clínica e industrial, mas apontam a necessidade de avaliação adequada da composição dos mesmos afim de escolher aquele mais efetivo para o controle de um microrganismo específico.

Palavras-chave: *Lippia alba*, quimiotipos, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Lippia alba is a native species, known as “erva cidreira”, currently used in folk medicine for the treatment of several diseases. Pharmacologic studies attributed their antimicrobial activity to the terpenoids present in the essential oils. Considering the variation on essential oil composition among *L. alba* accessions, the present work aimed to determine the essential oil composition of seven accession of *L. alba* collected in South Brazil, and to evaluate their antimicrobial activity against a panel of 22 bacterial and 9 yeast species. Essential oils were extracted by hydrodistillation and analyzed by GC and GC/MS. Antimicrobial activity (ID₅₀ and MIC) were determined by a serial dilution method (0 to 10 mg/ml) on microplates with growth evaluation by absorbance at 595nm. For ID₅₀ and MIC determination were considered the essential oil concentrations that reduced microbial growth on 50% and 90%, respectively. Bactericidal and bacteriostatic activities were determined after 3h treatment of the microorganisms with their individual MIC of each essential oil. Based on their main constituents, the results allowed characterizing the seven accessions of *L. alba* as chemotypes: citral, 1,8-cineol/camphor, linalool, linalool/mircene/camphor, carvone/caryophyllene, linalool/1,8-cineol/germacrene D, and limonene. Among these chemotypes, citral essential oils showed the largest antimicrobial spectrum, inhibiting both bacteria and yeasts. Oils with high concentration of carvone/caryophyllene, and limonene, were particularly effective against yeasts, and oils from chemotypes linalool and linalool/1,8-cineol/germacrene D exhibited inhibitory activity against several Gram positive and negative bacteria. At the MIC, citral showed bactericide effect on yeasts and *Salmonella*. However, other oils showed just bacteriostatic effects on most microorganisms. In general, our results confirm the activity of *L. alba* essential oils on both clinical and industrial microorganisms, but point out the necessity to properly evaluate essential oil composition to choose those more effective for the control of a specific microorganism.

Key words: *Lippia alba*, chemotypes, antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais é uma das mais antigas estratégias empregadas para o tratamento de enfermidades humanas e muito da informação a respeito de seu uso vem através do conhecimento popular. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades tem recebido incentivos de Órgãos Governamentais Nacionais e Internacionais devido ao uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos, que vêm selecionando microrganismos resistentes às drogas utilizadas. Muitos pacientes têm dificuldade na melhora clínica e, muitas vezes só a conseguem com o uso prolongado de antimicrobianos ou com a combinação de vários deles. Assim, vê-se a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que sejam capazes de eliminar o agente causador da doença e que não provoquem reações adversas ou desagradáveis no seu usuário. Para tanto muitas pesquisas vêm sendo realizadas na busca de medicamentos naturais a base de plantas e de seus extratos, como por exemplo, os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são misturas de substâncias orgânicas, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, ricas em metabólitos secundários com predominância de compostos que apresentam estrutura básica isoprenóide, sendo esses componentes denominados de terpenos. Diversos terpenos apresentam atividade contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Pesquisas realizadas com óleos essenciais extraídos de diversas plantas mostram que 60% deles apresentam atividade antifúngica e 30% atividade antibacteriana.

Muitos estudos estão sendo realizados nessa área, inclusive com *Lippia alba*, considerada uma das mais importantes plantas medicinais e aromáticas da América do Sul devido a sua ampla distribuição geográfica. Porém nenhum deles mostra-se completo no que diz respeito à caracterização e propriedades biológicas dos distintos quimiotipos e ecotipos já identificados, fato de grande importância ao considerar que a atividade biológica de extratos vegetais, entre os quais os óleos essenciais, depende da sua composição química.

Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de sete acessos de *Lippia alba*, coletados na região Sul do Brasil, sobre diversos microrganismos, dentre eles bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras, com a finalidade de determinar sua eficiência, espectro de ação e concentração inibitória mínima. A avaliação sobre um grande número de microrganismos justifica-se pela obtenção de um panorama geral de ação antimicrobiana e potencial aplicação dos distintos quimiotipos de *L. alba*. Assim, o conhecimento da ação antimicrobiana dos quimiotipos de *Lippia alba* poderá aumentar a eficiência e segurança terapêutica pela sua escolha adequada, e não pela simples utilização genérica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos essenciais e atividade antimicrobiana de plantas.

Nos últimos anos tem havido um grande interesse na investigação das propriedades químicas e farmacológicas de plantas medicinais (Silva *et al.*, 2003; Barbosa-Filho *et al.*, 2005; Barbosa-Filho *et al.*, 2006 a, b, c). As plantas possuem uma ampla capacidade de sintetizar substâncias aromáticas, as quais são geralmente obtidas de suas flores, frutos, folhas, sementes e raízes (Geissman, 1963; Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Em muitos casos estas substâncias servem como mecanismo de defesa da planta contra predadores, como microrganismos, insetos e herbívoros (Schultes, 1978). Os óleos essenciais são usados para diversos propósitos: na perfumaria, em bebidas, na conservação de alimentos e produtos farmacêuticos e também como terapia médica alternativa (Mishra & Dubey, 1994; Lawless, 1995; Reyn-olds, 1996; Lis-Balchin & Deans, 1997; Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2007).

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto sua própria história (Cowan, 1999; Gottlieb & Borin, 2002). Seu uso se dava tanto para fins nutricionais como para fins terapêuticos. Produtos naturais de algumas plantas, fungos, bactérias e outros organismos continuam a ser usados em preparações farmacêuticas (Araújo & Leon, 2001). Devido ao desenvolvimento progressivo da resistência microbiana, um grande número de pesquisas científicas esta dando ênfase a propriedades antimicrobianas de produtos oriundos de plantas (Hernández *et al.*, 2003; Silva-Santos *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Gayoso *et al.*, 2005; Michelin *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006 a, b; Tavares *et al.*, 2008).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Em contrapartida, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (Simões, 2003). Devido à sua diversidade vegetal, o Brasil é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos vegetais com ação medicinal, produtos estes já largamente utilizados na medicina popular das diversas regiões do país (Holetz *et al.*, 2002).

Embora as indústrias químicas e farmacêuticas tenham produzido uma imensa variedade de diferentes antibióticos nos últimos tempos, cada vez mais tem sido observado um aumento da resistência das bactérias a essas drogas usadas para fins terapêuticos (Cohen, 1992; Pereira *et al.*, 2004). O problema dos microrganismos resistentes está crescendo, e a perspectiva para o uso de antibióticos é indefinida. Por isso, medidas devem ser tomadas para resolver este problema, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, pesquisar para melhor entender o mecanismo genético de resistência e desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (Nascimento *et al.*, 2000).

No início da década de noventa aproximadamente um terço da população dos Estados Unidos usou algum tipo de terapia não convencional (Eisenberg *et al.*, 1993). Entre os fatores que motivam esse aumento pela procura por drogas vegetais como recurso terapêutico estão: a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos convencionais, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (Rates, 2001).

A distribuição mundial do mercado de fitoterápicos em 2001 foi de 3,9 bilhões de dólares na América do Norte, US\$ 6,9 bilhões na Europa, US\$ 7,4 bilhões na Ásia,

sendo somente US\$ 2,3 bilhões no Japão, US\$ 600 milhões na América do Sul e US\$ 800 milhões nos demais países e regiões, totalizando US\$ 19,6 bilhões (Funari, 2005). No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. Mas o uso de plantas como uma fonte de medicamentos já é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde (Shale *et al.*, 1990). No Brasil, o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4% (Simões, 2003).

Os óleos essenciais, assim como outros extratos naturais de plantas, vêm sendo considerados uma alternativa importante no controle microbiano tanto na área médica como na indústria de alimentos, bebidas, etc. Estes compostos são de um modo geral considerados GRAS (Generally Regarded as Safe) e com baixa probabilidade de geração ou seleção de resistentes devido a sua complexidade química e forma de ação. Segundo Daferera *et al.* (2003), sua origem natural é um meio mais seguro para o usuário e para o meio ambiente, pois apresenta menor risco de promover resistência microbiana aos seus componentes, já que são misturas de vários compostos que apresentam diferentes ações antimicrobianas, tornando assim, mais difícil a adaptação do microrganismo.

A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor de água, bem como os produtos obtidos de pericarpos de frutos cítricos. De forma geral são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões, 2003).

Os constituintes dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (Simões, 2003).

Um grande número de compostos presentes nos óleos essenciais apresentam atividades biológicas de interesse, tais como: ação antiinflamatória, pesticida, inseticida, antisséptica, herbicida, antioxidante, entre outras (Duke, 1994; Prabuseenivasan *et al.*, 2006). O mecanismo exato de ação dos óleos essenciais não é conhecido, porém, sua atividade biológica pode ser comparada com a atividade de produtos farmacológicos sinteticamente produzidos (Svoboda & Deans, 1995; Baratta *et al.*, 1998 a, b). Em geral, a ação dos óleos é o resultado de efeitos combinados de seus constituintes, os quais atuam rompendo ou desestruturando a membrana microbiana, causando perda de várias enzimas e nutrientes (Cowan, 1999; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001). Alguns trabalhos vêm relatando que os efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana tem sido resultado do caráter lipofílico dos óleos essenciais. Os monoterpenos dividem a fase aquosa dentro das estruturas de membrana de procariontes, o que resulta em sua expansão e aumento da permeabilidade alterando a função das proteínas de membrana inibindo a respiração celular e modificando o transporte de íons através dela (Sikkema & Poolman, 1994, 1995; Pina – Vaz *et al.*, 2004).

O óleo essencial de orégano, por exemplo, e seus constituintes timol e carvacrol, se acumulam sobre a membrana celular de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, resultando em um aumento de cerca de 90% da permeabilidade celular desses microrganismos (Lambert *et al.*, 2001).

A atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais tem sido avaliada amplamente contra microrganismos. A avaliação de propriedades antimicrobianas de óleos essenciais abrange uma grande variedade de microrganismos contra os quais têm sido testados, incluindo microrganismos deteriorantes de alimentos (Zaika *et al.*, 1983; Connor & Beuchat, 1984; Janssen *et al.*, 1988; Ouattara *et al.*, 1997; Sandri *et al.*, 2007), microrganismos produtores de toxinas alimentares (Beuchaut, 1976; Tharib *et al.*, 1983; Deans & Ritchie, 1987; Lisbalchin & Deans, 1997; Sandri *et al.*, 2007), fungos patogênicos, leveduras (Boonchild & Flegel, 1982; Ghannoum, 1988) e vírus de plantas e animais (Ieven *et al.*, 1982; Romerio *et al.*, 1989). A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica (Didry, 1993; Conner, 1993; Smid, 1996; Helander, 1998; Delamare *et al.*, 2007).

Algumas plantas vêm sendo estudadas em relação à composição química e atividades farmacológicas, um exemplo delas é a *Curcuma longa* L. (Peret-Almeida, 2006). Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos óleos essenciais de cúrcuma já foram descritas na literatura (Jitoe *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 2002 a, b; Peret-Almeida *et al.*, 2003). O óleo essencial desta planta apresentou atividade contra: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Fusarium moniliforme*, *Candida pallencens*, *Fusarium oxysporum*, *Candida falcatum* e *Aspergillus niger* (Singh *et al.*, 2002 a, b).

Os monoterpenos, sesquiterpenos entre outras substâncias, têm sido relatados como substâncias presentes em óleos essenciais com potencial atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (Cowan, 1999). Sacchetti *et al.* (2005) avaliou a atividade

antimicrobiana de 11 óleos essenciais de diferentes plantas nas concentrações de 0,01 a 0,75 mg/mL. De acordo com os resultados obtidos, todos os óleos essenciais mostraram uma moderada atividade inibidora contra as leveduras: *Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lypolitica*.

Uma planta tradicionalmente utilizada no sul do Brasil e no Uruguai é *Myrtus communis* L., da família Myrtaceae, conhecida popularmente como “mirta”. Sua folha é empregada no tratamento de problemas estomacais, na forma de infusão e apresenta efeitos antihiperglicêmicos e antimutagênicos (Elfellah *et al.*, 1984; Hayder *et al.*, 2003). Pesquisa feita com o óleo essencial desta planta mostrou, pela técnica de difusão em disco, que os valores de inibição do crescimento bacteriano foram de 57,7% para *Bacillus subtilis* e de 71,4% para *S. aureus* quando comparados ao crescimento controle (Salvagnini *et al.*, 2008).

As propriedades antibacterianas dos óleos essenciais são exploradas em diversos produtos comerciais, como antissépticos, conservantes de alimentos e suplementos alimentares (Cowan, 1999; Hancock, 1997). Foi testada a atividade antimicrobiana de três monoterpenos (linalol acetato, mentol e timol), que são encontrados como compostos majoritários de diversos óleos essenciais, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que os monoterpenos testados inibiram o crescimento destes microrganismos. No entanto, *Staphylococcus aureus* apresentou maior sensibilidade do que *Escherichia coli*, ou seja, uma concentração inibitória mínima de 0,31 mg/mL para timol; 0,62 mg/mL para mentol e 1,25 mg/mL para linalol acetato enquanto que *Escherichia coli* 5,0 mg/mL para timol; 2,5 mg/mL para mentol e 5,0 mg/mL para linalol acetato (Trombetta *et al.*, 2005).

Muitos óleos essenciais incluindo os óleos de *Cedrela fissilis* (cedro), *Matricaria recutita* (camomila) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto), demonstram ser particularmente

efetivos, inibindo a germinação e o crescimento vegetativo de esporos de *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum* (Chaibi *et al.*, 1997; Ultee *et al.*, 1999, 2000; Valero & Salmerón, 2003). Foi observada a diminuição na produção de toxina por *Bacillus cereus* na presença do composto majoritário carvacrol, que também atua como bactericida, sendo que sua ação é dependente da concentração e do tempo de exposição (Ultee *et al.*, 1999, 2000). Este mostrou ter efeito bactericida sobre *Salmonella spp* em fragmentos de peixe armazenados a temperatura de 4° Celsius (Hulin *et al.*, 1998). O óleo essencial de canela também mostrou efeito inibitório significativo sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).

Algumas bactérias contaminantes de alimentos foram testadas frente ao óleo de algumas espécies de *Cunila*. As bactérias mais sensíveis a estes óleos foram: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* dentre as Gram positivas e *Aeromonas hydrophila* dentre as Gram negativas (Sandri *et al.*, 2007). Quanto aos óleos essenciais das distintas espécies de *Cunila* avaliadas o óleo de *Cunila galioides* quimiotipo citral apresentou o mais amplo espectro de ação, inibindo o crescimento de 14 das 15 cepas testadas (Sandri *et al.*, 2007).

O potencial de extratos de plantas e fitofármacos em modelos de linhagens de microrganismos multirresistentes a drogas foram avaliados, como também o efeito conjunto da associação dos extratos com antibióticos. Os extratos de cravo-da-índia, jambolão, romã e tomilho quando associado a antibióticos apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (Chandler *et al.*, 1982). O extrato de alho, quando combinado com ampicilina, inibiu o crescimento *Klebsiella pneumoniae* (Bisset *et al.*, 1994). O crescimento de *Proteus spp* foi inibido quando se associou extrato de cravo-da-índia com tetraciclina (Carvalho *et al.*, 1988). Como resultados da avaliação, os

autores puderam concluir que os extratos estudados apresentaram atividade antimicrobiana, inclusive sobre microrganismos resistentes a antibióticos, agindo isoladamente ou associados a antibióticos (Nascimento *et al.*, 2000).

2.2 *Lippia* sp: Descrição, propriedades farmacológicas e composição química.

O decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, fortalece e amplia as ações políticas voltadas ao setor, constituindo-se num marco regulatório histórico. Como objetivo geral, esta política visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Uma das espécies medicinais nativas promissoras ao desenvolvimento de um novo medicamento é sem dúvida *Lippia alba* (Heinzmann & Barros, 2007).

O gênero *Lippia* pertence à família Verbenaceae que possui cerca de 175 gêneros e 2800 espécies, difundidas nos trópicos e subtropicais nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas espécies no Hemisfério Norte (Barroso, 1991). O gênero *Lippia* é formado por aproximadamente 200 espécies de plantas distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas da América, África e Ásia (Terblanché & Kornelius, 1996). A espécie *Lippia alba* é originária dos Andes (Chile, Peru) e atualmente pode ser encontrada em todas as regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, Central e ilhas do Caribe (Lemos *et al.*, 1990). É amplamente distribuída em todo o território brasileiro, como planta espontânea em terrenos abandonados, ou cultivada em hortas medicinais. Trata-se de um arbusto aromático medindo até 2 metros de altura, com ramos finos, esbranquiçados, arqueados e quebradiços com folhas

opostas, elípticas de largura variável, com bordos serreados, ápice agudo e flores reunidas em inflorescências capituliformes de eixo curto (Matos, 1998; Lorenzi & Matos, 2002; Martins *et al.*, 2002). Apresenta extensa sinonímia popular: erva cidreira, chá de tabuleiro, cidrila, alecrim selvagem, cidreira brava, falsa melissa, carmelitana, salva do Brasil, salva, salva limão, alecrim do campo e salva brava (Correa, 1992; Lorenzi & Matos, 2002).

Extratos e infusão de folhas e flores de *Lippia alba* são usados na medicina popular de diversos países para tratamento de gripes, resfriados, bronquites, tosse, asma, febre, diarreia, insônia, doenças bucais, dores abdominais, problemas digestivos e hepáticos, sífilis, tratamentos cardiovasculares, hipertensão e outras doenças (Alea *et al.*, 1997; Vale *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001; Gazola *et al.*, 2004). Na maioria dos casos as partes utilizadas são folhas, partes aéreas e flores, sendo preparadas como infusão e administradas via oral (Pascual *et al.*, 2001). Segundo Matos (1998), por serem desprovidas de ações tóxicas, as infusões podem ser consumidas em altas dosagens.

Os constituintes predominantes nos óleos essenciais podem variar qualitativa e quantitativamente, em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, resultante de precipitação, fatores geográficos e climáticos (Correa, 1992; Matos, 1998; Aguiar *et al.*, 2008). As condições ambientais são capazes de causar algumas variações nas plantas, mas a composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para o seu estágio de desenvolvimento, dando origem aos quimiotipos ou raças químicas tão freqüentes em plantas ricas em óleos essenciais. Isto significa que as diferenças na composição dos diferentes quimiotipos da espécie *L. alba* não constituem um produto apenas da

influência de fatores ambientais, mas refletem principalmente a variação genotípica destas plantas (Tavares *et al.*, 2005). Vinte e sete acessos de *L. alba* coletados no Rio Grande do Sul, Brasil, foram analisados por marcadores visando avaliar sua variabilidade genética. A variabilidade genética geral entre acessos foi muito elevada quando comparada com outras espécies (Manica-Cattani *et al.*, 2009).

Lippia alba possui alguns quimiotipos já identificados, que apresentam diferenças quanto a composição química do óleo essencial (Julião *et al.*, 2003). A avaliação da composição de seus óleos essenciais mostra elevada variedade, por exemplo, presença de três quimiotipos (citral, limoneno, e 1,8-cineol) em amostras do Pará, Brasil (Zoghbi *et al.*, 1998); limoneno como composto principal dos óleos essenciais de *Lippia alba* coletada na Guatemala (Senatore *et al.*, 2001); linalol no Uruguai (Lorenzo *et al.*, 2001) e carvona e limoneno na Colômbia (Stashenko *et al.*, 2003). Vêm sendo relatado com maior frequência na literatura quimiotipos contendo citral, carvona e linalol como constituintes majoritários (Zoghbi *et al.*, 1998; Maia *et al.*, 2001; Atti-Serafini *et al.*, 2002). Estudos fitoquímicos realizados com *Lippia alba* de diferentes estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás) permitiu separar as plantas em grupos para os quais foram registrados a presença de linalol, 1,8-cineol, cânfora, óxido de cariofileno, β -mirceno, canfeno, citral, D-limoneno, germacreno D e carvona (Mendes, 2001).

Devido ao aumento da resistência microbiana e aos inúmeros efeitos colaterais dos antibióticos sintéticos, tem havido um crescente interesse pela utilização de produtos naturais ou seus derivados como agentes de controle de populações microbianas (Cherry, 1999). Na Guatemala foi realizado um teste de seleção de plantas com potencial antimicrobiano para tratamento de infecções respiratórias causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*, sendo

que *Lippia alba* foi capaz de inibir o crescimento desses três microrganismos. (Cáceres *et al*, 1991).

Alea *et al* (1997), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia alba* sobre bactérias de interesse clínico. O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana principalmente sobre bactérias Gram positivas com concentração inibitória mínima variando entre 0,3 e 0,63 mg/mL. De todas as bactérias testadas apenas *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria Gram negativa) mostrou-se resistente às concentrações utilizadas. Todas as bactérias Gram positivas foram sensíveis, sendo *Staphylococcus aureus* inibido com a menor dose do óleo.

Com o objetivo de aumentar o tempo de prateleira de frutas in natura (acerola, laranja, mamão, manga e tomates) a atividade de óleos essenciais de *Lippia alba* foi avaliada sobre fungos deteriorantes. Frutas visivelmente deterioradas foram “embebidas” em óleo de *Lippia alba*, os resultados mostraram efeito inibidor sobre o fungo *Geotricchum spp* (Oliveira, 2000). Também foram testados vapores do óleo de *L. alba* contra patógenos fungicos da cana-de-açúcar. O óleo mostrou-se altamente efetivo no controle da germinação de telesporos de *Ustilago scitaminea* e conídeos de *Colletotrichum falcatum* e *Curvularia lunata*. Também mostrou efeito superior a fungicidas comerciais no controle de fungos patogênicos de plantas (Rao *et al*, 2000).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais de *L. alba* (quimiotipos citral e mirceno-citral) já foi confirmada contra patógenos humanos, como *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans* e *Trichophytum rubrum* (Oliveira *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos tem identificado timol, carvacrol, ρ -pineno, α -pineno, mirceno, 1,8-cineol, γ -terpineno, ρ -metadieno, metil-timol, metil-carvacol, linalol, 4-terpineol, limoneno, carvona, citral, β -cariofileno e cânfora como compostos encontrados no óleo

essencial de *Lippia alba* (Lemos *et al.*, 1990; Matos, 1996; Matos *et al.*, 1996; Leal *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2006; Mesa-Arango *et al.*, 2009).

Outras espécies de *Lippia*, como *Lippia sidoides* apresentam como principal constituinte o timol, um potente anti-séptico do grupo fenol, o qual tem uma comprovada atividade contra bactérias e fungos (Matos & Oliveira, 1998; Lacoste *et al.*, 1996; Lemos *et al.*, 1990). Já o trabalho de Botelho *et al.*, (2007), mostrou a eficiência do óleo essencial de *Lippia sidoides* contra patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

O efeito antimicrobiano do óleo essencial de *L. sidoides* contra *Staphylococcus aureus* pode ser reconhecido como um efeito bacteriostático. Esta propriedade bacteriostática é caracterizada quando algum composto é capaz de causar a falência do metabolismo bacteriano e impedir o crescimento (Smith-Palmer *et al.*, 1998; Burt, 2004). O efeito antimicrobiano do óleo essencial de *L. sidoides* em diferentes microrganismos patogênicos, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp* e *Trichosporon spp*, também foram reportados por outros pesquisadores (Lemos *et al.*, 1990; Laxoste, 1994; Lima *et al.*, 1994; Siani *et al.*, 2000; Pontes, 2002; Costa *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). Recentemente também foi evidenciada a ação do óleo essencial de *L. sidoides* contra a larva do mosquito *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* (Costa *et al.*, 2005).

Lippia gracilis, nativa do nordeste brasileiro, apresenta elevada atividade antimicrobiana e antifúngica (Matos *et al.*, 1999), atribuída a presença dos dois componentes majoritários, do seu óleo essencial: timol (10,13%) e carvacrol (41,77%) (Rasooli & Mirmostafa, 2003). Estudo realizado por Albuquerque *et al.* (2006), mostrou que *Lippia gracilis* foi eficiente na inibição de algumas bactérias que comumente

causam contaminação em laboratórios de cultura de tecidos de planta, tais como *Salmonella sp*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus*. Também mostrou atividade antifúngica para alguns fungos causadores do mesmo problema, tais como *Geotrichum candidum*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata* e *Aspergillus niger*.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Linhagens Bacterianas.

As linhagens microbianas utilizadas nos ensaios pertencem à coleção do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. A lista das linhagens utilizadas encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1. Linhagens microbianas utilizadas nos testes de avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia alba*.

	Código de identificação	Origem
Leveduras		
<i>Candida albicans</i>	L106	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/ UCS
<i>Candida guilliermondii</i>	IZ 1239	Instituto de Zimotécnico USP
<i>Candida pseudotropicalis</i>	IOC 2697	Instituto Oswaldo Cruz
<i>Candida sake</i>	L06	Departamento de Genética- ESALQ/USP
<i>Candida utilis</i>	IZ 300	Instituto de Zimotécnico USP
<i>Pichia guilliermondii</i>	L08	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AH 22	Departamento de Genética- ESALQ/USP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC 9765	American Type Culture Collection
<i>Schwanniomyces castelli</i>	58-7	Departamento de Genética- ESALQ/USP
Bactérias Gram positivas		
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	American Type Culture Collection
<i>Bacillus megatherium</i>	IBBac 103	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Bacillus subtilis</i>	IBBac 101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Enterococcus sp</i>	IBEnt 101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Lactobacillus casei</i>	CCT 1465	Coleção de Culturas Tropical
<i>Lactobacillus helveticus</i>	CCT 3747	Coleção de Culturas Tropical
<i>Lactococcus lactis</i>	CCT 0360	Coleção de Culturas Tropical
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19117	American Type Culture Collection
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	American Type Culture Collection
Bactérias Gram negativas		
<i>Acinetobacter sp</i>	ATCC 1870	American Type Culture Collection
<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	American Type Culture Collection
<i>Aeromonas sobria</i>	ATCC 43979	American Type Culture Collection
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	American Type Culture Collection
<i>Klebsiella sp</i>	IBKle101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Proteus mirabilis</i>	L68	Universidade de São Paulo (USP)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IBPpseudo 102	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 4973	American Type Culture Collection
<i>Pseudomonas sp</i>	IBPpseudo 101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Salmonella spp*</i>	ATCC 14028	American Type Culture Collection
<i>Salmonella typhimurium*</i>	ATCC 6539	American Type Culture Collection
<i>Serratia sp</i>	IBSer101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS
<i>Shigella spp</i>	IBShi101	Laboratório de Microbiologia Aplicada – INBI/UCS

*ATCC 14028 e ATCC 6539 pela nova classificação é denominada de *S. enterica* var. *enterica*, mas para fins do trabalho será adotada a classificação anterior.

3.2. Óleos essenciais de *Lippia alba*.

Foram utilizados óleos essenciais de sete acessos de *Lippia alba*, coletados em diferentes localidades da região sul do Brasil, e levados a Universidade de Caxias do Sul (UCS) onde foram cultivados. Após o crescimento das plantas na área da Universidade, os ramos apicais, laterais e as folhas foram coletados no período de janeiro e fevereiro de 2008. As amostras frescas foram sujeitas a destilação por arraste a vapor seguindo padrões estabelecidos por Atti-Serafini *et al.* (2002). O óleo obtido foi separado da água e seco em Na₂SO₄.

As análises em GC foram realizadas num cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series, equipado com um processador de dados HP-Chemstation, utilizando-se uma coluna HP-Innowax (30 m x 320 µm i.d.) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA), temperatura da coluna, 40°C (8 min) para 180°C a 3°C/min, 180-230°C a 20°C/min, 230°C (20 min); temperatura de injetor 250°C; razão de split 1:50, detector de ionização de chama (detector FID) com temperatura de 250°C; gas de arraste Hélio (34Kpa), volume injetado 1µL diluído em hexano (1:10).

As análises em GC/MS foram realizadas num cromatógrafo gasoso acoplado a detector seletivo de massas Hewlett Packard 6890/MSD5973, equipado com software HP Chemstation e espectroteca Wiley 275. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-Innowax (30 m x 250 µm) 0,50 µm espessura de filme (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). O programa de temperatura utilizado foi o mesmo usado no GC: interface 280°C; razão de split 1:100; gás de arraste He (56 Kpa); razão de fluxo: 1,0 mL/min.; energia de ionização 70 eV; volume injetado 0,4 µL diluído em hexano (1:10).

3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da dose inibitória 50 (DI50).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada bactéria foi avaliada através de teste de diluições seriadas do óleo essencial para cada quimiotipo, baseada no método descrito por Elsom e Hide (1999). Para tanto foi utilizado caldo Mueller Hinton (Himedia), em microplacas, contendo as concentrações de 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 da solução de óleo base, e branco (sem óleo). Estas diluições correspondem a concentração de 10; 5; 2,5; 1,25 ; 0,625; 0,3125; 0,1562 e 0 mg/mL de óleo de *Lippia alba*. Utilizou-se como diluente DMSO (Sigma), baseado em testes preliminares realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Microbiologia Aplicada nesta Universidade. A solução de óleo base (100 mg/mL) foi preparada utilizando-se 30 µl DMSO, 100µl de óleo e 870µl de água.

Foi colocado um volume de 180 µl de caldo Mueller Hinton nos orifícios da primeira linha e 100µl nas seguintes. Em seguida foram colocados 20µl de óleo (solução base) nos orifícios da primeira linha e com um micropipetador multicanal foram retirados 100µl dos orifícios desta linha e colocados no orifício da segunda linha e assim subsequentemente, exceto na última linha da microplaca. Após foram semeados 5µl de cada bactéria em fase exponencial de crescimento (aproximadamente 10^8 UFC/ml), em 88 orifícios com bactéria e deixando 8 orifícios como controle. As microplacas foram incubadas a 37°C com agitação orbital de 12rpm (rotações por minuto) por aproximadamente 24 horas.

A leitura de crescimento foi realizada em um leitor de ELISA (Biochrom Libra S12) com comprimento de onda de 595nm. Para cada ensaio foram feitas três

repetições.

Para cálculo da percentagem de inibição, as leituras densitométricas das amostras com o óleo essencial foram comparadas com o crescimento na ausência deste, e expressas na forma de percentagem de crescimento. Para fins da determinação da DI50 foram considerados a redução de 50% da população microbiana. Por outro lado, foram consideradas percentagens de inibição iguais ou superiores a 90% para a CIM, correspondentes a leituras inferiores a 0,05 unidades (Devienne e Raddi, 2002).

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para cada levedura também foi avaliada através de teste de diluições seriadas do óleo essencial, baseada no método descrito por Elsom e Hide (1999). E a DI50 foi determinada como a redução de 50% do crescimento das leveduras. Porém foi utilizado o meio de YEPD, específico para leveduras (glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, pH 6,8-7,0). Para as bactérias lácticas os procedimentos também foram os mesmos, mas o meio utilizado foi MRS (Himedia ®).

3.4. Teste de viabilidade versus tempo – Atividade microcida.

Para os testes de viabilidade foram utilizados os óleos essenciais de *Lippia alba* na concentração obtida no teste de CIM com os diferentes microrganismos. O teste foi realizado com os sete acessos para todas as leveduras avaliadas na CIM; e para bactérias foram selecionados três microrganismos sensíveis e dois resistentes no teste de CIM (aonde a concentração máxima avaliada foi de 10 mg/mL), tanto para Gram negativas como para Gram positivas.

Os microrganismos selecionados foram incubados em meio apropriado (YEPD ou MRS ou Caldo nutriente) por 24 ou 48 horas. Após crescimento, as amostras foram

lidas em espectrofotômetro (595 nm) e ajustadas para uma densidade ótica de 0,120 com adição de salina. Feita a diluição os microrganismos foram mantidos por 30 minutos em repouso. Após este período 900µl do diluído foram misturados com 100µl de emulsão (óleo, DMSO, água). Para controle foi utilizado uma emulsão com DMSO e água na mesma concentração da emulsão com óleo. As amostras foram retiradas no tempo zero e 180 minutos na presença de óleo, foram feitas diluições seriadas e o plaqueamento pelo método da gota (5µl) em placas com meio apropriado. Estas foram incubadas a 30°C por 48 horas no caso de leveduras e bactérias lácticas; e a 37°C por 24 horas no caso de bactérias. Passado o período foram feitas contagens de unidades formadoras de colônia, e os resultados foram expressos em redução do crescimento microbiano (log).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química dos óleos essenciais da espécie *Lippia alba*.

A composição química dos óleos essenciais pode variar muito, dependendo da região geográfica, da variedade e idade da planta, do método de secagem e extração do óleo (Jerkovic *et al.*, 2001; Bagamboula *et al.*, 2004). Entretanto alguns autores preconizam que o quimiotipo é o que determina a composição química dos óleos essenciais (Castro *et al.*, 2002, Simões, 2003, Tavares *et al.*, 2005, Manica- Cattani *et al.*, 2009, Stashenko *et al.*, 2004).

Segundo Tavares *et al.* (2005), a composição do óleo essencial de *Lippia alba* apresenta variação qualitativa e quantitativa, levando à separação em quimiotipos, fato também confirmado por Simões (2003), que mostrou que plantas diferentes nascidas em solos idênticos continham produtos diferentes, enquanto que plantas análogas nascidas em solos completamente diferentes formavam produtos análogos. A variação genética de *Lippia alba* não está associada com a origem geográfica, mas com o quimiotipo (Manica-Cattani *et al.*, 2009).

Pesquisas anteriores com outras plantas, como outra espécie de ocorrência no Sul do Brasil, *Cunilla galioides*, mostrou que plantas micropropagadas apresentam a mesma composição de óleo que a planta original, confirmando o controle genético da composição dos óleos essenciais (Echeverrigaray *et al.*, 2003). Neste trabalho foram utilizados óleos essenciais de sete acessos de *Lippia alba*, oriundas de plantas individuais primariamente coletadas em diferentes localidades da Região Sul do Brasil, e cultivadas no Instituto de Biotecnologia de Universidade de Caxias do Sul (Figura 1).

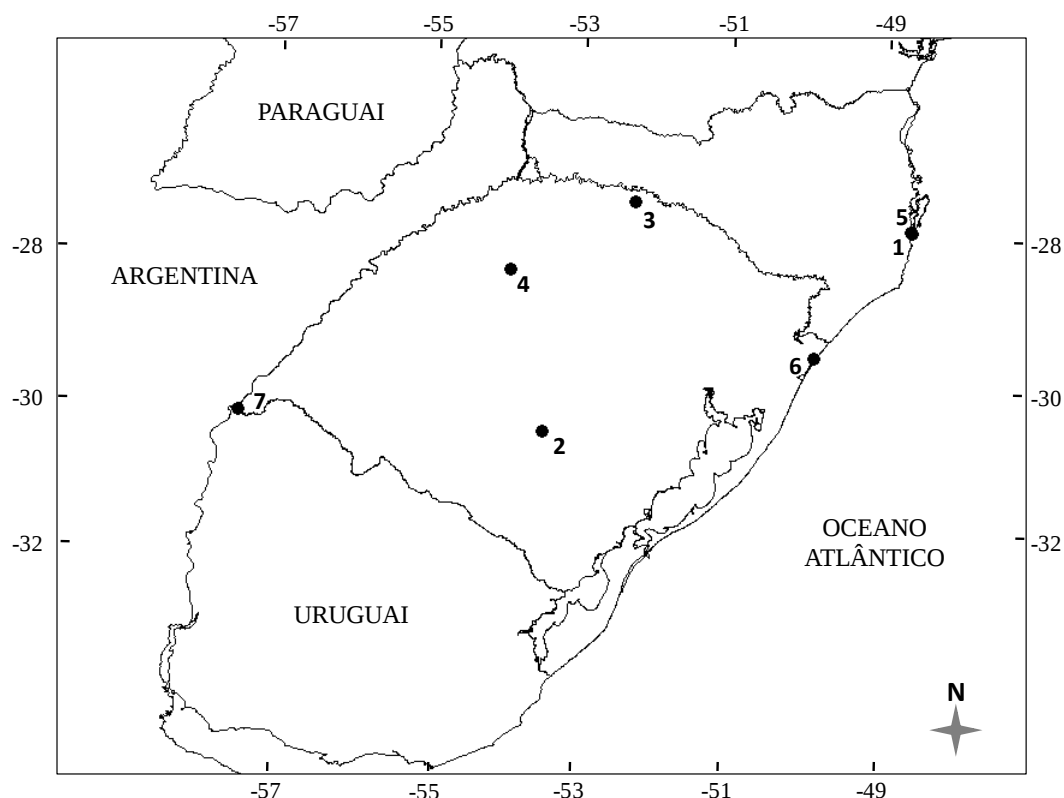


Figura 1. Mapa demonstrando a origem geográfica da coleta inicial dos sete acessos de *Lippia alba*.

Legenda: 1. Guarda do Embaú, 2. Caçapava, 3. Erechim, 4. Ijuí, 5. Pinheira, 6. Arroio do Sal, 7. Barra do Quaraí

As sete amostras representantes da espécie *Lippia alba* apresentam compostos majoritários distintos, algumas somente com um composto principal, outras com misturas de dois ou mais compostos. Neste trabalho foram considerados os compostos presentes em quantidades iguais ou maiores que 5% em cada acesso analisado.

O acesso 1, planta coletada na localidade de Guarda do Embaú, apresenta como componentes majoritários neral, geranial e β -cariofileno (Quadro 2), possuindo outros em baixas concentrações, tais como mirceno (3,3%) e outros em concentrações menores, sendo assim definido como quimiotipo citral. Este quimiotipo já foi encontrado em diversos locais do Brasil. No nordeste brasileiro foram encontrados neral e geranial (citral) como os constituintes químicos majoritários presentes no óleo

essencial de três espécies de *Lippia* (Matos *et al.*, 1996). Em amostras oriundas do estado do Pará (Brasil), foram reportados três quimiotipos, entre os quais neral e geranial (citril) (Zoghbi *et al.*, 1998). Este quimiotipo também foi encontrado em outras regiões do Brasil (Ventrella, 2000, Castro *et al.*, 2002, Juliao *et al.*, 2003, Barbosa *et al.*, 2006, Matos *et al.*, 2006). Em trabalho realizado na Índia, Rao *et al.* (2000) identificaram 50 componentes correspondentes a cerca de 90% do óleo total extraído das folhas de *L. alba*, sendo que o geranial representava 15,57% do óleo, seguido por uma variedade de outros componentes.

O acesso 2, quimiotipo 1,8-cineol/cânfora, planta coletada na localidade de Caçapava, apresenta como componentes majoritários cânfora, 1,8-cineol, β -cariofileno, germacreno B e linalol (Quadro 2), e baixa concentração de germacreno D (4,6%), α -amorfenol (4,7%), sabineno (4,0%), limoneno (4,0%), e outros ainda em concentrações menores. No estado do Pará (Brasil) foram identificados três quimiotipos, sendo um deles 1,8-cineol (Zoghbi *et al.*, 1998). Entretanto, até o presente não há referências a plantas de *Lippia alba* do quimiotipo 1,8-cineol/cânfora.

Plantas coletadas em Erechim, acesso 3, se caracterizaram por possuir como composto majoritário o linalol (Quadro 2) e outros em menores concentrações como germacreno D (4,6%), β -cariofileno (3,5%), limoneno (3,4%), e outros em concentrações menores, (quimiotipo linalol). Já o acesso 4, quimiotipo linalol/mirceno/cânfora, planta coletada em Ijuí, apresenta linalol, mirceno, cânfora e β -cariofileno como componentes majoritários (Quadro 2), além de germacreno D (4,9%), canfeno (4,2%), limoneno (3,8%) e outros em menores concentrações.

Por outro lado, plantas coletadas em Arroio do Sal (acesso 6) apresentaram altas concentrações de linalol, 1,8-cineol, germacreno D e β -cariofileno (Quadro 2), sendo assim consideradas como quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D/cariofileno. Além

destes compostos, o óleo do acesso 6 apresentou em sua composição baixas concentrações de germacreno B (3,5%), sabineno (1,9%) e outros.

Trabalho realizado no Uruguai identificou em plantas de *L. alba* dois quimiotipos linalol (Lorenzo *et al.*, 2001). Já nas plantas de *L. alba* coletadas da região sudeste e nordeste foram evidenciados três quimiotipos, sendo linalol um deles (Juliao *et al.*, 2003). Em plantas cultivadas na Índia, a análise da composição do óleo essencial de *L. alba* mostrou que o maior constituinte foi o linalol (65%) (Bahl *et al.*, 2000). O linalol (69,3%) também foi referido como o componente majoritário do óleo essencial das folhas de *L. alba* neste mesmo estudo (Mallavarapu *et al.*, 2000). Analisando a composição do óleo essencial das partes aéreas de *L. alba*, originária do Uruguai identificaram-se 27 componentes que correspondem a 93% do total do óleo, sendo que o linalol (55%) foi considerado o componente majoritário (Lorenzo *et al.*, 2001).

O acesso 5, planta coletada na localidade de Pinheira, apresenta transdihidrocarvona, β -cariofileno e cis- α -bisaboleno como componentes majoritários (Quadro 2), e germacreno B (4,9%), limoneno (4,8%) e outros em menores concentrações, sendo neste trabalho considerado como quimiotipo carvona/cariofileno.

A análise na composição do óleo essencial de *Lippia alba* feita por Alea *et al.* (1997) encontraram alto conteúdo de carvona. No Pará foram identificados três quimiotipos, e um deles é, limoneno/carvona (Zoghbi *et al.*, 1998). E plantas coletadas na região sudeste e nordeste do Brasil também foi isolado óleo do quimiotipo carvona (Juliao *et al.*, 2003). Análise da composição química do óleo essencial de um quimiotipo de *L. alba* originada de Cuba, revelou a presença de quarenta e dois componentes no óleo essencial, sendo o composto majoritário carvona (Pino e Ortega, 1996). Este quimiotipo também foi identificado na Colômbia (Stashenko *et al.*, 2003).

Quadro 2. Origem, denominação e composição química dos sete acessos de *Lippia alba* coletados na região Sul do Brasil.

Acessos	Origem	Denominação utilizada-quimiotipo	Composição majoritária
1	Guarda do Embaú	citral	32,7% geranial 22,8% neral 20,5% β -cariofileno
2	Caçapava	1,8-cineol/cânfora	15% cânfora 13,3% 1,8-cineol 6,7% β -cariofileno 5,8% germacreno B 5,5% linalol
3	Erechim	linalol	75,5% linalol
4	Ijuí	linalol/mirceno/cânfora	24,6% linalol 13,4% mirceno 12,8% cânfora 9,8% β -cariofileno
5	Pinheira	carvona/cariofileno	25,5% transdihidrocarvona 21,2% β -cariofileno 5,8% Cis α -Bisaboleno
6	Arroio do Sal	linalol/1,8-cineol/ germacreno D	59,1% linalol 8,1% 1,8-cineol 6,8% germacreno D 5,5% β -cariofileno
7	Barra do Quaraí	limoneno	45,8% limoneno 16,2% β -cariofileno

Por último, o acesso 7, planta coletada em Barra do Quaraí, foi definido como quimiotipo limoneno por apresentar limoneno e β -cariofileno como componentes majoritários (Quadro 2) e outros em menores concentrações. Já foram reportados quimiotipo limoneno, mas em concentrações menores do que encontrado no presente trabalho. Quimiotipo limoneno já foi identificado na Colômbia (Stashenko *et al.*, 2003) e na Guatemala (Senatore & Rigano, 2001). E no Brasil um quimiotipo limoneno/carvona (Zoghbi *et al.*, 1998).

Todavia, vários estudos mostram que esta espécie apresenta grande diversidade em seus constituintes principais, tendo sido identificados quimiotipos com altos teores de carvona, germacreno D, limoneno, piperitona, γ -terpineno, linalol e 1,8-cineol (Zoghbi *et al.*, 1998, Stashenko *et al.*, 2004, Senatore *et al.*, 2001, Atti-Serafini *et al.*, 2002, Tavares *et al.*, 2004).

De acordo com Tavares *et al.* (2005) as diferenças quimiotípicas apresentam base genética, já que no caso presente, as plantas cultivadas em condições semelhantes mantem a composição química original.

Considerando que a atividade biológica dos óleos essenciais, assim como outros extratos vegetais, dependem da composição química dos mesmos (Cowan, 1999, Bakkali *et al.*, 2008), a variabilidade na composição intra e inter populacional do óleo essencial de *Lippia alba* representa um problema na comercialização e aplicação para propósitos medicinais e outros (Manica-Cattani *et al.*, 2009). Assim sendo, torna-se necessário o conhecimento de todos os variantes químicos (quimiotipos) e sua atividade biológica. Neste particular, foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de sete quimiotipos de *Lippia alba* coletados na região sul do Brasil, descrito neste item.

4.2 Inibição do crescimento microbiano do óleo essencial de sete quimiotipos de *Lippia alba*.

Os óleos de *Lippia sp* têm sido utilizados popularmente no tratamento de doenças infecciosas, e alguns trabalhos vêm mostrando o seu efeito no controle de microrganismos (Bassolw *et al.*, 2005, Souza *et al.*, 2005, Albuquerque *et al.*, 2006). Porém, para a utilização destes óleos como antibacterianos e antifúngicos se faz necessária a determinação de alguns parâmetros, dentre eles a Concentração Inibitória

Mínima (CIM) (Lambert, 2000). Assim, conforme descrito no material e métodos, a CIM foi avaliada pelo método de diluição em microplacas associado à leitura espectrofotométrica do crescimento bacteriano. Foram utilizados dois critérios de determinação de inibição do crescimento microbiano: CIM (dose que reduz 90% do crescimento) e a DI 50 (dose necessária para inibir 50% o crescimento).

Na análise de DI 50, o óleo do quimiotipo citral (acesso 1) foi capaz de reduzir 50% do crescimento da maioria dos microrganismos nas dosagens testadas, apresentando amplo espectro de ação sobre bactérias e leveduras. Por outro lado, os quimiotipos cineol/cânfora, linalol/mirceno/cânfora e carvona/cariofileno, acessos 2, 4 e 5, respectivamente, inibiram preferencialmente bactérias Gram positivas, sendo que dentre estes, o óleo do acesso 4 não foi capaz de inibir as leveduras. Já os óleos caracterizados como quimiotipos linalol (acesso 3) e linalol/ 1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) mostraram resultados semelhantes entre si, com inibição sobre bactérias Gram positivas e negativas. Este fato pode ser atribuído a ambos apresentarem linalol como composto majoritário. É interessante notar o comportamento do óleo do quimiotipo limoneno (acesso 7), o qual inibiu preferencialmente o crescimento de leveduras (Figura 2).

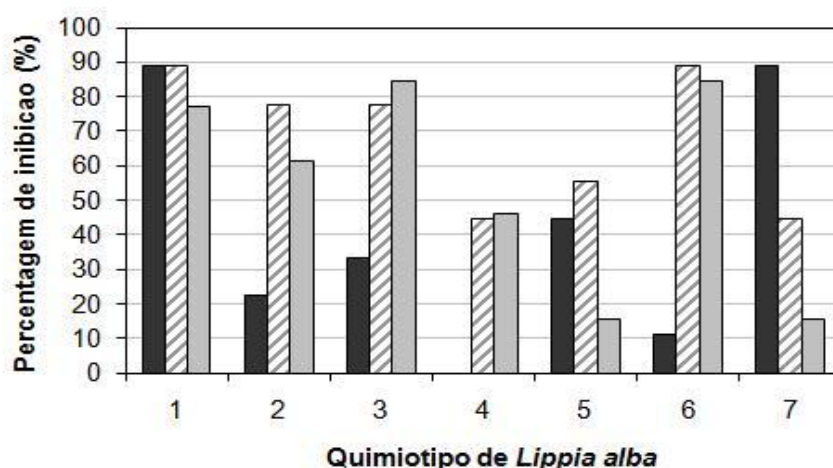


Figura 2: Percentual de microrganismos que são inibidos 50% do crescimento (DI50) pelos sete quimiotipos de *Lippia alba* (mg/mL).

Legenda: ■ Leveduras, ▨ Bactérias Gram positivas, ■ Bactérias Gram negativas. 1-quimiotipo citral, 2- quimiotipo 1,8-cineol/cânfora, 3- quimiotipo linalol, 4-quimiotipo linalol/mirceno/cânfora, 5-quimiotipo carvona/cariofileno, 6- quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D, 7- quimiotipo limoneno.

As doses de inibição de 50% do crescimento microbiano dos óleos essenciais dos sete quimiotipos variam para as leveduras. Sendo que os óleos do quimiotipos citral (acesso 1) e limoneno (acesso 7) apresentaram valores de DI 50 que variaram de 1,8 a 7,7 mg/mL e 1,7 a 9,7 mg/mL para as diferentes leveduras, respectivamente (Tabela 1), sendo particularmente eficientes sobre espécies clínicas de *Cândida*, apresentando somente valores acima de 10mg/mL para *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* AH22.

Por outro lado, o óleo do quimiotipo carvona/cariofileno (acesso 5) nas concentrações de 2,5 a 10 mg/mL e o acesso 3 (linalol) na concentração de 3 a 10 mg/mL inibiram 50% do crescimento das leveduras. Já os quimiotipos cineol/cânfora (acesso 2) e linalol/1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) não podem ser considerados eficientes para levedura, porque as doses de inibição de 50% do crescimento são superiores a 9,0 mg/mL. O quimiotipo linalol/mirceno/cânfora (acesso 4) não foi capaz

de inibir em 50% o crescimento das leveduras testadas, apresentando concentrações superiores a 10 mg/mL para todas elas (Tabela 1).

Para as bactérias Gram positivas os óleos que apresentaram menores valores de DI50 foram os quimiotipos citral (acesso 1) com DI50 entre 0,7 a 3,5 mg/mL, linalol/1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) com DI50 entre 0,1 e 8,3 mg/mL, linalol (acesso 3) com valores de DI50 variando entre 0,3 e 8 mg/mL, e limoneno (acesso 7) com DI50 entre 0,1 e 10 mg/mL. Os óleos dos demais quimiotipos também apresentaram capacidade em reduzir 50% o crescimento bacteriano, porém em concentrações de óleo mais elevadas, tais como: 1 a 10 mg/mL para o quimiotipo cineol/cânfora (acesso 2); 4,1 a 7,5 mg/mL para linalol/mirceno/cânfora (acesso 4); e 3,2 a 8,7 mg/mL para carvona/cariofileno (acesso 5) (Tabela 1).

Já sobre bactérias Gram negativas os óleos dos quimiotipos que apresentaram melhores concentrações para reduzir o crescimento em 50% foram: citral (acesso 1) com DI50 entre 0,3 a 6,6 mg/mL; linalol (acesso 3) com concentração inibitórias entre 0,6 a 8,5 mg/mL e linalol/1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) com DI50 de 0,6 a 7,3 mg/mL. Outros quimiotipos apresentaram capacidade em reduzir o crescimento em 50%, porém quando em concentrações mais elevadas de óleo, tais como cineol/cânfora (acesso 2) entre 4,4 a 8,5 mg/mL; linalol/mirceno/cânfora (acesso 4) entre 1,2 a 10 mg/mL; e carvona/cariofileno (acesso 5) entre 2,9 a 5 mg/mL (de somente duas bactérias). O quimiotipo limoneno (acesso 7) foi o que apresentou os maiores valores de DI50, sendo assim o menos eficiente sobre bactérias Gram negativas (Tabela 1).

Tabela 1: Dose de inibição dos sete acessos de *Lippia alba* (mg/ml) capazes de inibir em 50% o crescimento de leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.

	1 DI 50*	2 DI 50*	3 DI 50*	4 DI 50*	5 DI 50*	6 DI50*	7 DI 50*
Leveduras							
<i>Candida albicans</i>	3,7	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	5,2
<i>Candida guilliermondii</i>	1,8	9,8	> 10	> 10	5,5	> 10	1,7
<i>Candida sake</i>	3,6	>10	3	> 10	6	> 10	6,3
<i>Candida pseudotropicalis</i>	3,3	>10	8	> 10	> 10	> 10	6,7
<i>Candida utilis</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	2,7	> 10	7,2
<i>Pichia guilliermondii</i>	6,5	>10	> 10	> 10	2,5	> 10	9,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,7	>10	5	> 10	> 10	9,4	> 10
<i>Saccharomyces cerevisiae AH22</i>	5,3	9,3	> 10	> 10	> 10	> 10	8
<i>Schwanniomyces castelli</i>	7,7	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	8,1
Bactérias Gram positivas							
<i>Bacillus megaterium</i>	3,5	1	8	> 10	6,5	0,1	> 10
<i>Bacillus cereus</i>	3,5	4,4	1,8	> 10	8,7	0,8	> 10
<i>Bacillus subtilis</i>	0,7	7	0,3	> 10	> 10	2	> 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	8,3	5	5,7	> 10	0,6	> 10
<i>Enterococcus spp</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	2,5	> 10
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	10	> 10	> 10	3,2	7,1	3,3
<i>Lactococcus lactis</i>	0,9	5,7	0,8	6,2	8,6	>10	6,1
<i>Lactobacillus casei</i>	2,5	> 10	1,8	7,5	5	8,3	0,1
<i>Lactobacillus helveticus</i>	1,5	1,7	0,9	4,1	> 10	2	1
Bactérias Gram negativas							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3,5	> 10	> 10	10	5	5,5	> 10
<i>Shigella spp</i>	2,2	> 10	4	2,5	> 10	0,6	> 10
<i>Salmonella spp</i>	2,7	6,6	7,2	> 10	> 10	4,2	> 10
<i>Salmonella typhimurium</i>	3,5	7,8	1,6	> 10	> 10	2,5	> 10
<i>Proteus spp</i>	6	5	7	> 10	> 10	7,3	> 10
<i>Serratia spp</i>	4	8,5	6,7	5,7	> 10	4	> 10
<i>Pseudomonas SP</i>	0,5	> 10	8,5	> 10	> 10	> 10	8,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,5	7,6	6,3	> 10	> 10	> 10	8,5
<i>Acinetobacter spp</i>	> 10	4,4	> 10	2,2	2,9	0,9	> 10
<i>Klebsiella spp</i>	>10	> 10	1,3	> 10	> 10	4,3	> 10
<i>Escherichia coli</i>	>10	> 10	2,6	> 10	> 10	3,2	> 10
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,3	6	0,6	1,2	> 10	2,5	> 10
<i>Aeromonas sóbria</i>	1,5	6,2	1,8	6,9	> 10	2,5	> 10

Legenda: 1- quimiotipo citral, 2- quimiotipo 1,8-cineol/cânfora, 3- quimiotipo linalol, 4- quimiotipo linalol/mirceno/cânfora, 5- quimiotipo carvona/cariofileno, 6- quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacrenoD, 7- quimiotipo limoneno. * DI 50 – dose de inibição de 50% do crescimento.

O óleo do quimiotipo citral (acesso 1) inibiu 90% do crescimento (CIM) de 67% das leveduras e das bactérias Gram positivas, e 46% das Gram negativas (Figura 3). Mostrou ser o mais eficiente para as leveduras testadas. Outras plantas que apresentam citral na sua composição também mostram ser eficiente na inibição de microrganismo, como no caso de *Cymbopogon citratus* (Cimanga *et al.*, 2002), *Melissa officinalis* (Mimica-Dukic *et al.*, 2004), *Cunila galioides* quimiotipo citral (Sandri *et al.*, 2007).

Já o óleo do acesso 3 (quimiotipo linalol) inibiu 90% do crescimento (CIM) principalmente das bactérias Gram positivas. E o óleo do acesso 6 (quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D) mostrou-se eficiente principalmente para bactérias Gram negativas (Figura 3). O óleo do quimiotipo limoneno (acesso 7) mostrou-se mais eficiente para as leveduras, não inibindo nenhuma das bactérias analisadas, fato este que pode estar associado as diferenças estruturais e composição das membranas bacterianas e de leveduras (Bakkali *et al.*, 2008). Já o óleo do acesso 5 (quimiotipo carvona/cariofileno) também inibiu o desenvolvimento de leveduras, porém em menor grau do que o óleo do acesso 7 e do acesso 1.

Óleos com alto conteúdo de 1,8-cineol tem se mostrado eficientes no controle de bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas (Delamare *et al.*, 2007, Sandri *et al.*, 2007). Porém neste trabalho o óleo do acesso 2, quimiotipo 1,8-cineol/cânfora, não apresentou atividade evidenciável contra leveduras e exibiu atividade variada sobre bactérias (Figura 3). Resultados semelhantes para o acesso 4, quimiotipo linalol/mirceno/cânfora.

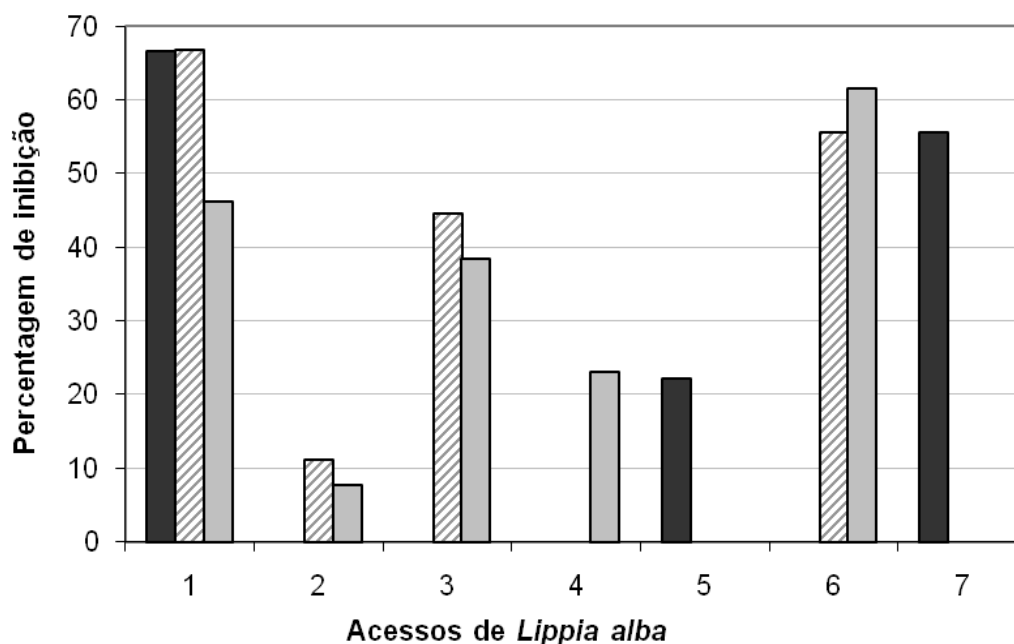


Figura 3: Concentração inibitória mínima dos sete quimiotipos de *Lippia alba* sobre leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Legenda: ■ Leveduras, ▨ Bactérias Gram positivas, ■ Bactérias Gram negativas. 1-quimiotipo citral, 2- quimiotipo 1,8-cineol/cânfora, 3- quimiotipo linalol, 4-quimiotipo linalol/mirceno/cânfora, 5-quimiotipo carvona/cariofileno, 6- quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D, 7- quimiotipo limoneno.

Para as leveduras os óleos dos quimiotipos que apresentaram capacidade em reduzir 90% do crescimento dentro das concentrações avaliadas foram: citral (acesso 1), com CIM variando entre 4,2 e 10 mg/ml; carvona/cariofileno (acesso 5) com valores de CIM de 7,6 a 10 mg/ml; e limoneno (acesso 7) CIM de 10 mg/ml. Nos demais quimiotipos não foi possível determinar as concentrações inibitórias mínimas por serem superiores à concentração máxima avaliada (Tabela 2).

Entre as bactérias Gram positivas, os quimiotipos que apresentaram maior eficiência na redução de 90% do crescimento foram: citral (acesso 1) com valores de CIM de 2,5 a 10 mg/ml; linalol (acesso 3) com CIM entre 1,0 e 10 mg/ml; e linalol/1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) com CIM entre 1,2 e 10 mg/ml (Tabela 2). Óleos de plantas com citral e linalol como composto majoritário inibem o crescimento bacteriano

(Sandri *et al.*, 2007, Simionatto *et al.*, 2007). Por outro lado, para o óleo do quimiotipo 1,8-cineol/cânfora (acesso 2) o CIM variou entre 9,5 a 10 mg/ml, fato que discorda de Prabuseenivasan *et al.* (2006). Já para os demais quimiotipos não foi possível determinar as concentrações inibitórias mínimas para bactérias Gram positivas (Tabela 2).

Nas bactérias Gram negativas os quimiotipos que foram mais eficientes na redução de 90% do crescimento microbiano foram: citral (acesso 1) com CIM entre 0,6 e 10 mg/ml; linalol (acesso 3) entre 3,7 e 10 mg/ml; e linalol/1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) entre 2,3 e 10 mg/ml (Tabela 2). Este dado confirma que os óleos dos acessos 1, 3 e 6 inibem bactérias preferencialmente. Para os outros quimiotipos os CIMs foram mais elevados, tais como 1,8-cineol/cânfora (acesso 2) variando entre 9,2 e 10 mg/ml; e linalol/mirceno/cânfora (acesso 4) com CIM entre 6,0 e 10 mg/ml. Já para os quimiotipos carvona/cariofileno (acesso 5) e limoneno (acesso 7) não foi possível estabelecer a CIM dentro das concentrações utilizadas (Tabela 2).

Analisando os dados obtidos nos testes de DI 50% e CIM podemos evidenciar que o óleo do quimiotipo citral reduziu o crescimento microbiano de leveduras e bactérias. Segundo Mesa-Arango *et al.* (2009), óleos de *L. alba* quimiotipo citral são eficientes na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus fumigatus*. O óleo essencial de *Backhousia citriodora* (92% de citral) mostrou atividade sobre *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (Hayes & Markovic, 2002).

Citral destaca-se por ser o composto principal de várias plantas medicinais (Bakkali *et al.*, 2008). Este composto além de apresentar ação antimicrobiana, tem sido evidenciado efeito sedativo e relaxante em elevadas doses, potencializando a ação de fenobarbital e induzindo o sono em cobaias (ratos) (Vale *et al.*, 2002).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos sete quimiotipos de *Lippia alba* sobre leveduras, bactérias Gram positivas e Gram negativas.

	1 CIM	2 CIM	3 CIM	4 CIM	5 CIM	6 CIM	7 CIM
Leveduras							
<i>Candida albicans</i>	10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Candida guilliermondii</i>	4,2	>10	> 10	> 10	9,5	> 10	> 10
<i>Candida sake</i>	8,7	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	10
<i>Candida pseudotropicalis</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	10
<i>Candida utilis</i>	> 10	>10	> 10	> 10	7,6	> 10	10
<i>Pichia guilliermondii</i>	9,7	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9,8	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Saccharomyces cerevisiae AH22</i>	9,9	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	10
<i>Schwanniomyces castelli</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	10
Bactérias Gram positivas							
<i>Bacillus megaterium</i>	9,2	> 10	> 10	> 10	> 10	4,6	> 10
<i>Bacillus cereus</i>	>10	9,2	>10	> 10	> 10	1,2	> 10
<i>Bacillus subtilis</i>	9	>10	1	> 10	> 10	4,2	> 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,5	> 10	9	> 10	> 10	8,8	> 10
<i>Enterococcus spp</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	9,8	> 10
<i>Listeria monocytogenes</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	>10
<i>Lactococcus lactis</i>	2,5	> 10	5	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Lactobacillus casei</i>	8,5	> 10	7,5	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Lactobacillus helveticus</i>	5,5	> 10	>10	> 10	> 10	> 10	> 10
Bactérias Gram Negativas							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	9,7	> 10
<i>Shigella spp</i>	5	> 10	9	10	> 10	2,3	> 10
<i>Salmonella spp</i>	>10	> 10	>10	> 10	> 10	8,8	> 10
<i>Salmonella typhimurium</i>	9,7	> 10	5,3	> 10	> 10	8	> 10
<i>Proteus spp</i>	10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Serratia spp</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Pseudomonas sp</i>	10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Acinetobacter spp</i>	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	7,6	> 10
<i>Klebsiella spp</i>	>10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
<i>Escherichia coli</i>	>10	> 10	4,3	> 10	> 10	6,2	> 10
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,6	>10	3,7	6	> 10	4,3	> 10
<i>Aeromonas sobria</i>	9	9,2	4,3	10	> 10	4,3	> 10

1-quimiotipo citral, 2- quimiotipo 1,8-cineol/cânfora, 3- quimiotipo linalol, 4-quimiotipo linalol/mirceno/cânfora, 5- quimiotipo carvona/cariofileno, 6- quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D, 7- quimiotipo limoneno

Os óleos essenciais podem ser utilizados como agentes antifúngicos porque eles afetam muitos alvos ou pontos simultaneamente e não há relatos particulares de resistência ou adaptação destes para com os óleos (Bakkali *et al.*, 2008). Neste trabalho

destacou-se como agente antifúngico o quimiotipo limoneno (acesso 7), que somente inibe o crescimento de leveduras, mas não os de bactérias. Fato também evidenciado por Magwa *et al.* (2006) com óleo de *Sesivium portulacastrum*.

Os quimiotipos linalol (acesso 3) e linalol/1,8-cineol/germacreno D (acesso 6) mostraram ser eficientes na inibição de crescimento tanto de bactérias Gram positivas, quanto Gram negativas e algumas leveduras. Alguns trabalhos também relatam a eficiência de óleos com linalol, como por exemplo: o óleo de *Citrus sinensis* (87% de linalol) eficiente sobre *Aspergillus niger* (Sharma & Tripathi, 2008); óleo essencial de *Croton cajucara* com importante inibição de *Candida albicans* (Alviano *et al.*, 2005), e o óleo de *Maleleuca alternifolia* capaz de inibir o crescimento de leveduras e bactérias (Carson *et al.*, 2006). No caso particular de *Lippia alba*, Duarte *et al.* (2005) verificaram atividade de óleo do quimiotipo linalol sobre *Candida albicans*.

Quando analisamos os perfis de redução do crescimento de leveduras em concentrações crescentes dos óleos essenciais dos quimiotipos de *Lippia alba*, podemos observar que os gráficos de percentagem de crescimento mostram uma tendência linear de inibição, como no caso de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* na presença do quimiotipo citral; *Picchia guillermundii* na presença de limoneno; *Candida guillermundii* no óleo do quimiotipo carvona/cariofileno (Figura 4). Por outro lado, sobre outras leveduras o óleo dos distintos quimiotipos, em baixas concentrações, há uma redução drástica do crescimento e em altas concentrações uma pequena variação populacional, como no caso de *Candida guillermundii* na presença dos quimiotipos citral e limoneno (Figura 4). Entretanto, os óleos dos quimiotipos 1,8-cineol/canfora, linalol, linalol/mirceno/canfora e linalol/1,8-cinel/germacreno D não reduzem o crescimento das diferentes leveduras testadas (Figura 4).

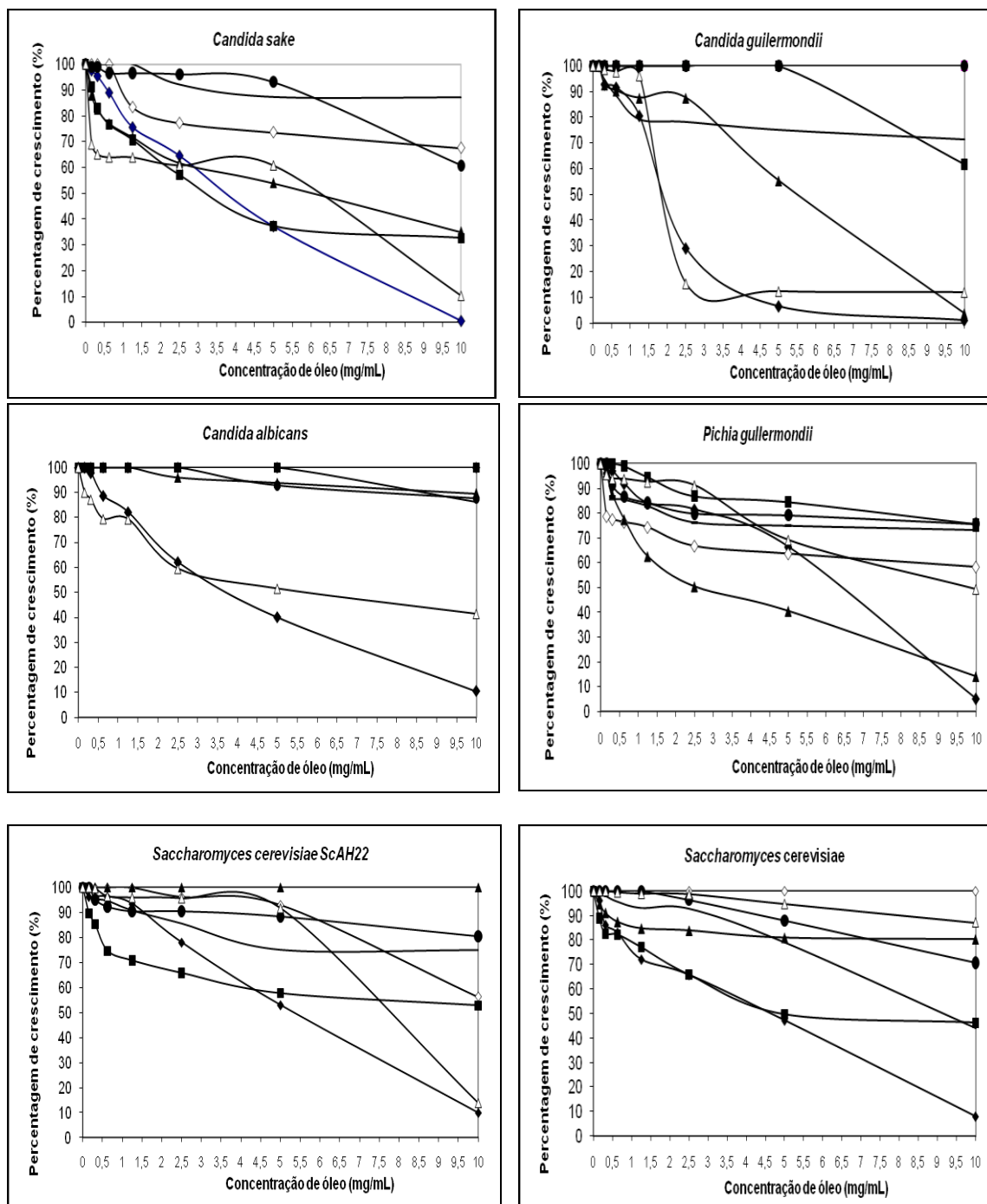


Figura 4: Inibição do crescimento de leveduras pelos sete quimiotipos de óleos essenciais da espécie *Lippia alba*. Quimiotipos analisados: citral (◆), 1,8-cineol/cânfora (◇), linalol (■), linalol/mirceno/canfora (●), carvona/cariofileno (▲), linalol/1,8-cineol/germacrenoD (+) e limoneno (△).

As diferentes respostas de leveduras contra os distintos óleos podem estar relacionadas às diferenças de composição de membranas, já que os terpenos atuam na

despolarização da membrana da mitocôndria, inibição do transporte de íons pela membrana celular, redução do gradiente de pH e/ou afetam a bomba de ganho de ATP na respiração (Bakkali *et al.*, 2008).

Nas curvas apresentadas nas Figura 5 e 6, pode ser evidenciado que existe uma correlação negativa entre concentração de óleo e crescimento bacteriano, sendo possível notar dois tipos de resposta: uma redução linear ou um decaimento exponencial do crescimento bacteriano.

Bactérias como, *Staphylococcus aureus* na presença de óleos dos quimiotipos 1,8-cineol/canfora ou linalol/mirceno/canfora, e *Salmonella sp* na presença de óleos do quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D ou linalol exibiram redução linear do crescimento (Figuras 5 e 6). Por outro lado, em algumas bactérias ocorreu uma redução drástica do crescimento em baixas concentrações de óleos essenciais, seguida de uma redução lenta em concentrações maiores de óleo, como no caso *Aeromonas hydrophila*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus helveticus* na presença de óleo do quimiotipo citral e de *Bacillus cereus* e *Bacillus megaterium* na presença do óleo do quimiotipo linalol/1,8-cineol/germacreno D. Os fenômenos envolvidos neste comportamento não têm sido elucidados apesar deste ter sido uma constante em diversos trabalhos com os mais diversos óleos essenciais e outros compostos utilizados no controle bacteriano (Devienne & Raddi, 2002, Sandri, 2004).

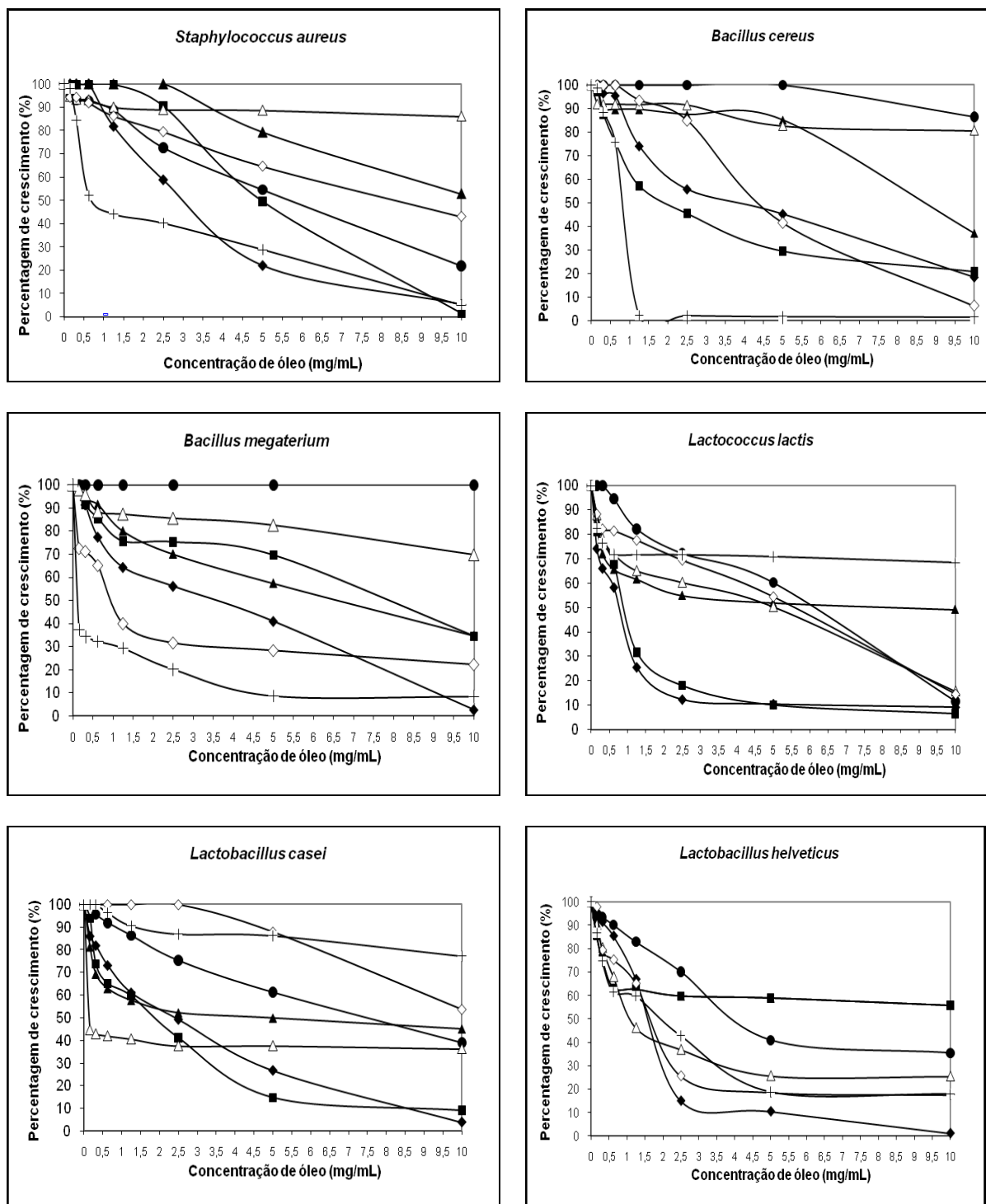


Figura 5: Inibição do crescimento de bactérias Gram positivas pelos sete quimiotipos de óleos essenciais da espécie *Lippia alba*. Quimiotipos analisados: citral (◆), 1,8-cineol/cânfora (◇), linalol (■), linalol/mirceno/canfora (●), carvona/cariofileno (▲), linalol/1,8-cineol/germacrenoD (+) e limoneno (△).

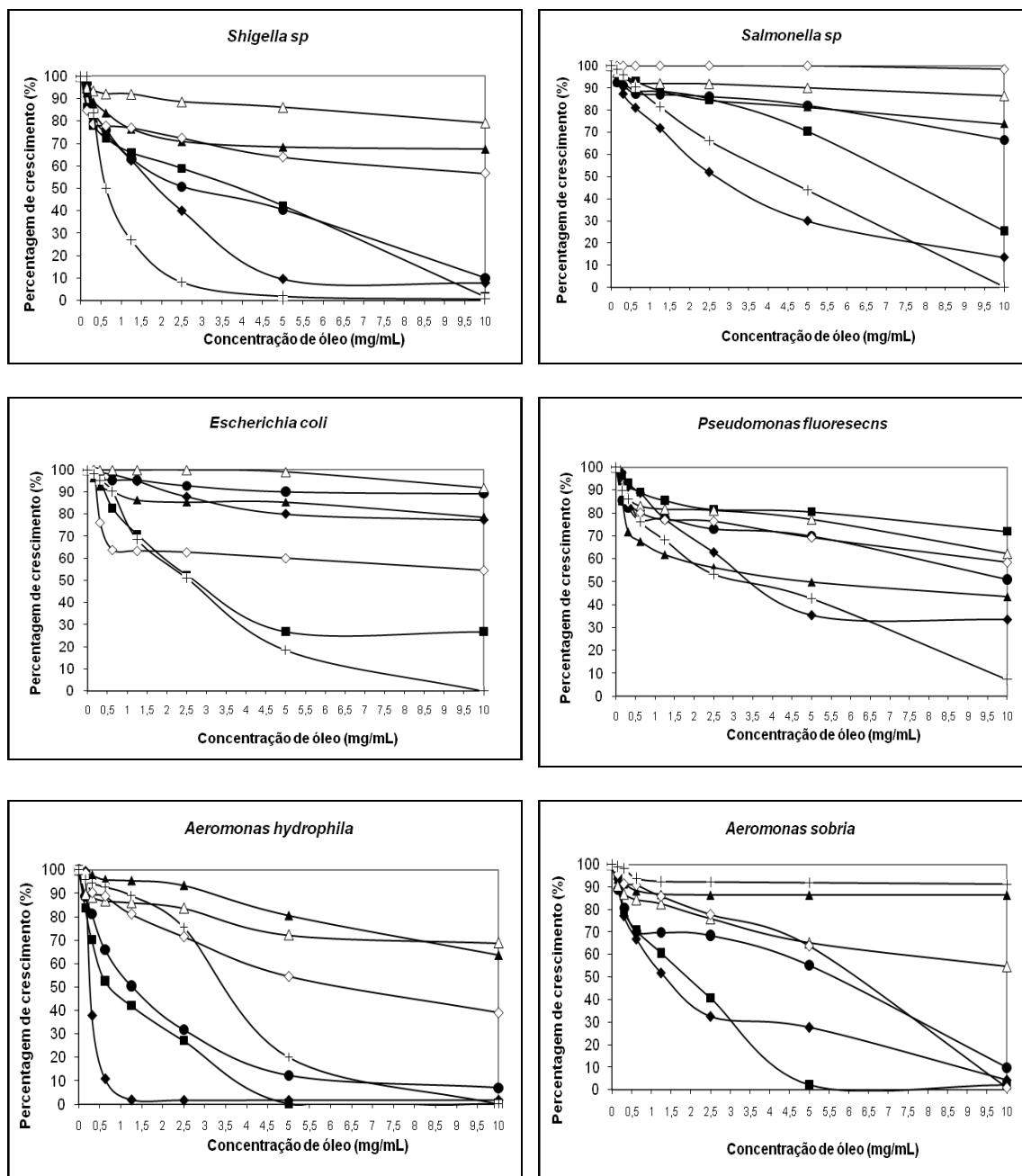


Figura 6: Inibição do crescimento de bactérias Gram negativas pelos sete quimiotipos de óleos essenciais da espécie *Lippia alba*. Quimiotipos analisados: citral (◆), 1,8-cineol/cânfora (◇), linalol (■), linalol/mirceno/canfora (●), carvona/cariofileno (▲), linalol/1,8-cineol/germacrenoD (+) e limoneno (△).

Cabe salientar, que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar associada a compostos majoritários, compostos minoritários e a interação entre compostos, fato que dificulta a dedução dos princípios ativos em extratos vegetais complexos como os óleos essenciais (Belaiche *et al.*, 1995; Lachowicz *et al.*, 1998).

Dos óleos essenciais analisados, o mais eficiente frente aos microrganismos testados foi o óleo de *Lippia alba* quimiotipo citral, particularmente eficiente no controle do crescimento de *C. albicans*, *C. guillermundii*, *P. guillermundii*, *S. cerevisiae*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. helveticus*, *A. hydrophila*, *Shighella sp*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas sp* (Tabela 2, Figura 4 a 6). Como mencionado anteriormente, este óleo apresenta altas concentrações das duas formas isoméricas do citral (neral e geranial), compostos com reconhecida atividade antimicrobiana (Dorman & Deans, 2000; Cimanga *et al.*, 2002; Sandri *et al.*, 2007). Por outro lado, o óleo essencial do quimiotipo limoneno foi eficiente na inibição de crescimento de leveduras (Tabela 2, Figura 4).

4.3. Avaliação da viabilidade microbiana na presença de óleos essenciais dos sete quimiotipos de *Lippia alba*.

Após a determinação da concentração inibitória mínima dos microrganismos, avaliou-se o efeito dos óleos sobre a viabilidade celular de todas as leveduras e algumas bactérias selecionadas com base nos resultados de DI50 e CIM. Cabe ressaltar que com este teste é possível determinar se o óleo tem uma ação microcida ou microstática.

Os óleos dos quimitipos citral (monoterpeno aldeído), carvona/cariofileno (monoterpeno hidrocarboneto/sesquiterpeno) e limoneno (monoterpeno hidrocarboneto) diminuíram a viabilidade celular da grande maioria das leveduras testadas (Figura 7). Por outro lado, os outros quiomiotipos somente reduziram a viabilidade de uma ou duas espécies de leveduras, somente o gênero *Candida* (Figura 7). As diferenças de susceptibilidade aos terpenos podem ser atribuídas a composição da membrana celular,

especialmente o conteúdo de esteróides envolvidos na tolerância ao etanol e outros alcoóis, e/ou à biotransformação de terpenos alcoólicos (King & Dickinson, 2000).

A maioria das leveduras na presença do quimiotipo citral teve uma redução de 4 logaritmos (Figura 7). Cabe comentar que as contagens iniciais (tempo zero) eram de 10^6 UFC/ml e o limite inferior de contagem esta em 10^2 UFC/mL. Sendo assim, reduções de 4 log foram consideradas uma potente ação fungicida do óleo sobre as leveduras.

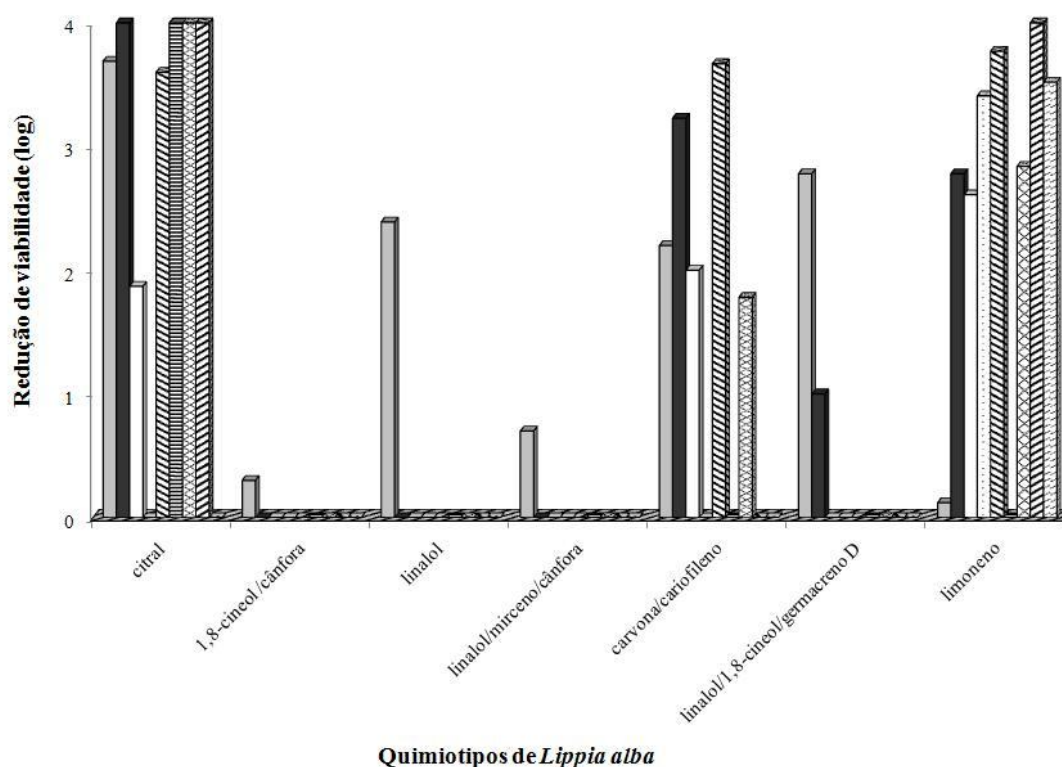


Figura 7. Redução de viabilidade (log) de leveduras na presença de óleo em concentração inibitória mínima (CIM), de sete quimiotipos de *Lippia alba*, em 180 minutos de exposição.

Legenda: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida utilis*, *Picchia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* (AH22), *Schwanniomyces castelli*.

Na presença do quimiotipo citral, as leveduras *Candida pseudotropicalis* e *Schwanniomyces castelli* não apresentaram redução evidenciável da viabilidade celular (Figura 7). Este resultado concorda com os obtidos pelo CIM (Tabela 2), aonde não foi determinada a concentração inibitória mínima, valor maior que 10 mg/mL. Por outro lado, o quimiotipo carvona/cariofileno reduziu a viabilidade de cinco das nove leveduras testadas (Figura 7), mesmo daquelas que não foi possível determinar a CIM (Tabela 2). O óleo do quimiotipo limoneno não reduziu a viabilidade de *Candida albicans* e *Picchia guilliermondii*, mas para as leveduras *Candida guilliermondii* e *Saccharomyces cerevisiae* foi constatada uma redução de 3 logaritmos na viabilidade (Figura 7). Cabe ressaltar que todas estas leveduras apresentaram CIM > 10 mg/mL (Tabela 2).

Para as bactérias Gram positivas, de modo geral, os óleos dos diferentes quimiotipos de *Lippia alba* apresentaram atividade bacteriostática (Figura 8), quando foram utilizados a concentração inibitória mínima previamente estabelecida (Tabela 2). A ação bacteriostática destes óleos pode ser vista, já que um acompanhamento de zero a três horas da viabilidade celular mostra que nas primeiras horas a um decaimento de um a dois logaritmos e após uma manutenção da viabilidade celular.

Enterococcus sp e *Listeria monocytogenes*, bactérias para as quais não foi possível determinar a concentração inibitória mínima em nenhum dos óleos testados (Tabela 2), também não mostram reduções de viabilidade celular quando utilizado 10 mg/ml de óleo (Figura 8). Por outro lado, *Bacillus megaterium* na presença dos óleos dos quimiotipos linanol/mirceno/cânfora e carvona/ cariofileno e *Staphylococcus aureus* com o quimiotipo limoneno, mesmo não sendo possível determinar a concentração inibitória mínima (Tabela 2), exibiu redução da viabilidade em 1 logaritmo após três horas de contato com 10 mg/ml de óleo (Figura 8).

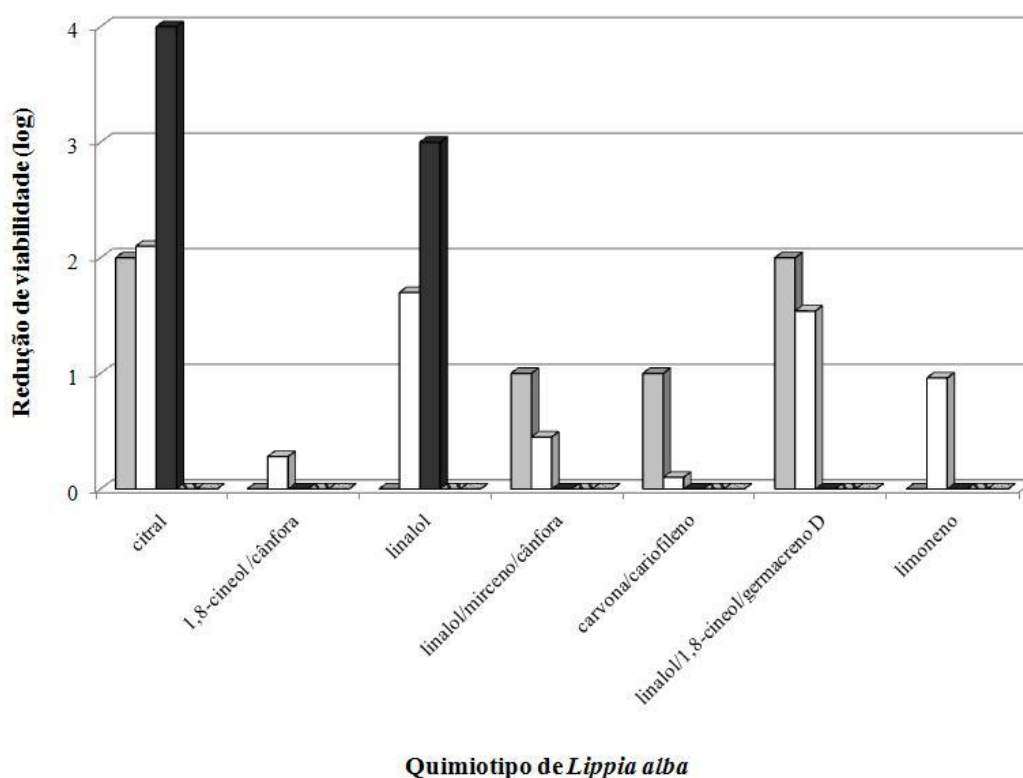


Figura 8. Redução de viabilidade (log) de bactérias Gram positivas na presença de óleo de sete quimiotipos de *Lippia alba*, na concentração inibitória mínima de óleo em 180 minutos de exposição.

Legenda: *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* sp., *Listeria monocytogenes*.

As bactérias Gram negativas também apresentaram redução de viabilidade celular pelos óleos de *Lippia alba* quimiotipos citral, linalol e linalol/1,8-cineol (Figura 9).

Entre as bactérias Gram negativas testadas, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* apresentaram maior redução de viabilidade celular (Figura 9), fato este que concorda com os resultados apresentados na avaliação da concentração inibitória mínima (Tabela 2).

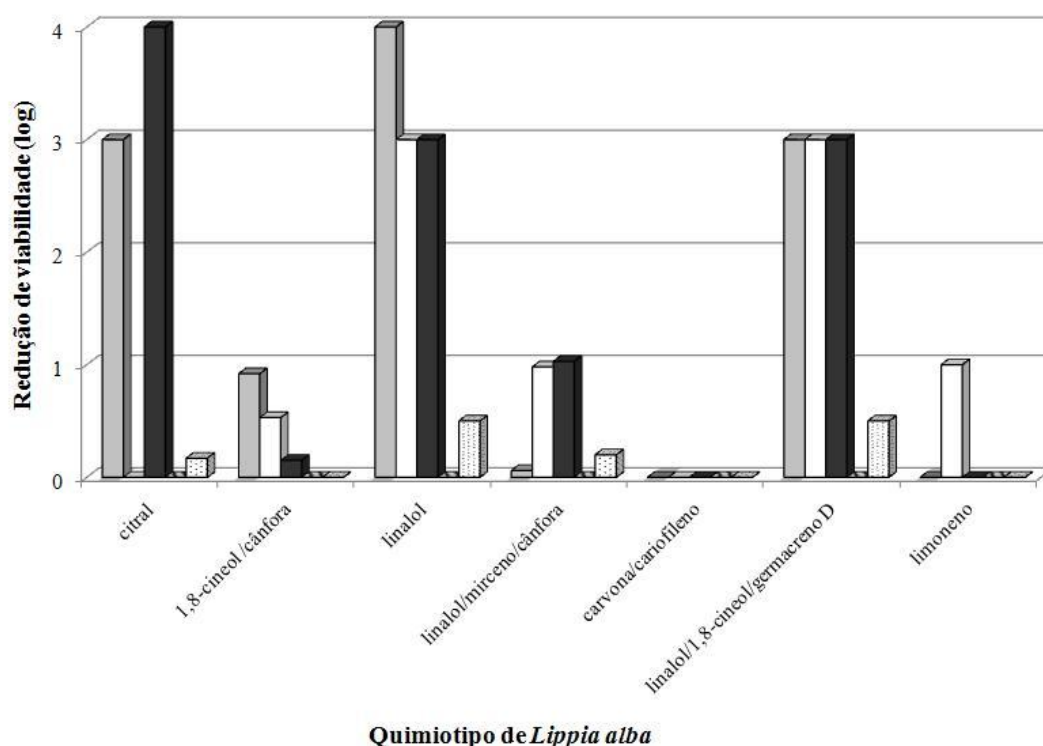


Figura 9. Redução de viabilidade (log) de bactérias Gram negativas na presença de óleo de sete quimiotipos de *Lippia alba*, na concentração inibitória mínima de óleo em 180 minutos de exposição.

Legenda: *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*.

O óleo do quimiotipo citral mostrou-se eficiente na inibição e na redução da viabilidade celular de leveduras e de bactérias. Já os óleos que apresentavam terpenos alcoólicos, como compostos majoritários, foram eficientes para bactérias, e os terpenos com aldeídos e hidrocarbonetos foram melhores para as leveduras. O fato dos terpenos responderem diferenciadamente para eucariontes e procariontes, pode estar relacionado a ação dos óleos sobre a membrana (Bakkali *et al*, 2008).

5. CONCLUSÕES

1. Os óleos essenciais da espécie *Lippia alba* coletados no sul do Brasil apresentam sete quimiotipos distintos: citral, 1,8-cienol/cânfora, linalol, linalol/mirceno/cânfora, carvona/cariofileno, linalol/1,8-cineol/germacreno D e limoneno.
2. Devido a composição variada, os efeitos antimicrobianos são muito distintos sobre microrganismos, sendo o quimiotipo citral o de maior espectro de ação.
3. Além do quimiotipo citral, o quimiotipo limonemo mostrou-se eficiente na inibição do crescimento de leveduras.
4. Os quimiotipos citral, linalol e linalol/1,8-cineol/germancreno D mostraram inibição no crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas.
5. Os óleos dos quimiotipos citral, carvona/carifileno e limoneno reduziram a viabilidade celular de leveduras.
6. Em geral, nossos resultados confirmam a atividade dos óleos essenciais de *L. alba* sobre microrganismos de importância clínica e industrial, mas apontam a necessidade de avaliação adequada da composição dos mesmos afim de escolher aquele mais efetivo para o controle de um microrganismo específico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, J. S.; Costa, M. C. C. D.; Nascimento, S. C.; Sena, K. X. F. R. (2008). Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farmacog.** 18: 436-440.
- Alea, J; Luis A.; Pérez, A.; Jorge, M. R.; Baluja, R. (1997). Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Rev Cubana Farmacol.** 30: 29-35.
- Albuquerque, C. C.; Câmara, T. R.; Ramos, R. L.; Willadino, M. L.; Marcelino, C. J.; Ulisses, C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **J. Braz. Arch. Biol. Technol.** 49: 527-535.
- Alviano, W. S.; Mendonça-Filho, R. R.; Alviano, D. S.; Bizzo, H. R.; Souto-Padrón, T.; Rodrigues, M. L.; Bolognese, A. M.; Alviano C. S.; Souza, M. M. (2005). Antimicrobial activity of Cróton cajucara Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiol Immunol.** 20: 101-105.
- Araújo, C. A. C.; Leon, L. L. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96: 723-728.
- Atti-Serafini, L.; Pansera, M. R.; Atti- Santos, A. C.; Rossato, M.; Pauletti, G. F.; Rota, L. D.; Paroul, N.; Moyna, P. (2002). **Rev. Bras. Plantas Medicinai.** 4: 72-74.
- Bagamboula, C. F.; Ulyttendaele M., Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S.flexneri*. **Int. J. Food. Microbiol.** 21: 33-42.
- Bahl, J. R. *et al.* (2000). Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plants. **J. Flav. Frag.** 15: 199-200

- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils: a review. **Food. Chem. Toxicol.** 46: 446-475.
- Baratta, M. T.; Dorman, H. J.D.; Deans, S. G.; Biondi, D. M.; Ruberto, G. (1998 a). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **J. Essent. Oil Res.** 10: 618-627.
- Baratta, M. T.; Dorman, H. J. D.; Deans, S. G.; Figueiredo, C.; Barroso, J. G.; Ruberto, G. (1998 b). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **J. Flav. Frag.** 13: 235-244.
- Barbosa, F. F.; Barbosa, L. C. A.; Melo, E. C.; Botelho, F. M.; Santos, R. H. S. (2006). Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Quim. Nova.** 29: 1221-1225.
- Barbosa-Filho, J. M.; Vasconcelos, T. H. C.; Alencar, A. A.; Batista, L. M.; Oliveira, R. A. G.; Guedes, D. N.; Falcão, H. S.; Moura, M. D.; Diniz, M. F. F. M.; Modesto-Filho, J. (2005). Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.** 15: 392-413.
- Barbosa-Filho, J. M.; Piuvezam, M. R.; Moura, M. D.; Silva, M. S.; Lima, K. V. B.; Cunha, E. V. L.; Fecine, I. M.; Takemura, O. S. (2006a). Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twentycentury review. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 109-139.
- Barbosa-Filho, J. M.; Medeiros, K. C. P.; Diniz, M. F. F. M.; Batista, L. M.; Athayde-Filho, P. F.; Silva, M. S.; Cunha, E. V. L.; Almeida, J. R. G. S.; Quintans-Júnior, L. J. (2006b). Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 258-285.
- Barbosa-Filho, J. M.; Martins, V. K. M.; Rabelo, L. A.; Moura, M. D.; Silva, M. S.; Cunha, E. V. L.; Souza, M. F. V.; Almeida, R. N.; Medeiros, I. A. (2006c).

- Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 421- 446.
- Barroso, G. M. (1991). Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: **UFV**. Vol. 3: 255p.
- Bassole, I. H. N.; Nebie, R.; Savadogo, A.; Quattara, C.T.; Barro, N.; Traore, S. A. (2005). Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. **Afric J Biotechnol.** 10: 1156-1160.
- Belaiche, T.; Tantaoui-Elaraki, A.; Ibrahimy, A. (1995). Application of a two levels factorial design no the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sci Aliments.** 15: 571-578.
- Bisset, N. M. (1994). Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. **CRC Press** 566.
- Boonchild, C.; Flegel, T. (1982). *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Can. J. Microbiol.** 28: 1235-1241.
- Botelho, M. A.; Nogueira, N. A. P.; Bastos, G. M.; Fonseca, S. G. C.; Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V. S.; Brito, G. A. C. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. J. Med. Biol.** 40: 349-356.
- Brasil. Atos do poder executivo. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e da outras providências.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **Int. J. Food Microbiol.** 94: 223-253.

- Caceres, A. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **J. Ethnopharmacol.** 31: 193-208.
- Carriconde, C. (1996). **Plantas medicinais e plantas alimentícias**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 153p.
- Carvalho, V.; Melo, V. M.; Aguiar, A.; Matos, F. S. (1988). Toxicity evaluation of medicinal plant extracts by the brine shrimp (*Arthenus salina* Leah) bioassay. **Cien. Cult.** 40: 1109-1111.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2006) *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clin. Microbiol. Rev.** 19: 50-62.
- Castro, D. M.; Ming, L. C.; Marques, M. O. M. (2002). Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill). N. E. Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Rev. Bras. Plantas Medicinai**s. 4: 75-9.
- Chaibi, A.; Alabouch, L. H.; Bekasri, K.; Boucetta, S.; Busta, F. F. (1997). Inhibition of germination and vegetative growth of *Baccillus cereus* T and *Clostridium botulinum* 62 A spores by essential oils. **Int. J. Food Microbiol.** 14: 161-174.
- Chandler, R. F.; Hooper, S. N.; Harvey, M. J. (1982). Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, Compositae. **Econ. Bot.** 36: 203-223.
- Cherry, J. P. (1999). Improving The Safety Of Fresh Produce With Antimicrobials. **Food Technol.** 53: 54-59.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.** 79: 213-220.

- Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. **Science**. 257: 1050.
- Conner, D. E. (1993). Naturally occurring compounds. **In: Antimicrobials and Foods**. Davidson P.M., Branem A. L. Eds., Dekker: New York, 441-468.
- Connor, D. E. & Beuchat, L. R. (1984). Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **J. Food Sci.** 49: 429-434.
- Correa, C. B. V. (1992). Anatomical and histochemical study of *Lippia alba* (Mill). **Rev. Bras. Farmacol.** 73: 57-64.
- Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Angélico, E. C.; Silva, M. R.; Mota, M. L.; Santos, N. K. A.; Cardoso, A. L. H.; Lemos, T. L. G. (2005). Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev. Bras Farmacogn.** 15: 304-309.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.** 12: 564-582.
- Cox, S. D.; Mann, C. M.; Markham, J. L.; Bell, H. C.; Gustafson, J. E.; Warmingtn, J. R.; Wyllic, S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oli). **J. Appl. Microbiol.** 88: 170-175.
- Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protect.** 22: 39-44.
- Deans, S. G. & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. **International J. Food Microbiol.** 5: 165-180.
- Delamare, A. P. L.; Moschen-Pistorello, I. T.; Artico, I.; Atti-Serafini, L.; Echeverrigaray, S. (2007), Antibacterial activity of the essencial oils of *Salvia*

- officinalis* L. and *Salvia tribola* L. cultivated in South Brazil. **Food Chem.** 100: 603-608.
- Devienne, K. F. & Raddi, M. S. G. (2002). Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz. J. Microbiol.** 33:166-8.
- Didry, N.; Dubreuil, L.; Pinkas, M. (1993). Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde singly or in combinations. **Pharmazie.** 48: 301-304.
- Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microbiol.** 88: 308-316.
- Duarte, M. C. T.; Figueira, G. M.; Sartoratto, A.; Rehder, V. L. G.; Delarmelina, C. (2005). Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 97: 305- 311
- Duke, J. A. (1994). **Biologically-Active compounds important spices, herbs and edible fungi.** Amsterdam: Edit by George Charalembours, 595p.
- Echeverrigaray, S.; Fracaro, F.; Santos, A. C. A.; Paroul, N.; Wasum, R.; Atti-Serafini, L. (2003). Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. **Biochem. System. Ecology.** 31: 467-475.
- Eisenberg, D. M. R. C.; Kessler, C.; Foster, F. E.; Norlock, D. R.; Calkins, T. L. (1993). Unconventional medicine in the United States: prevalence, costs and patterns of use. **N. Engl. J. Med.** 328: 246–252.
- Elfellah, M. S.; Akhter, M. H.; Khan, M. T. (1984). Antihyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. **J. Ethnopharmacol** 11: 275-281.

- Elsom, G. K. F. & Hide, D. (1999). Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin. **J. Antimicrob. Chemother.** 43: 427–428
- Funari, C. S.; Ferro, V. O. (2005). Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.** 15: 178-82.
- Gazola, R.; Machado, D.; Ruggiero, C.; Singi, G.; Alexandre, M. M. (2004). *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extratcts on the isolated hearts of rats. **Pharmacol. research.** 50: 477-480.
- Gayoso, C. W.; Lima, E. O.; Oliveira, V. T.; Pereira, F. O.; Souza, E. L.; Lima, I. O.; Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia.** 76: 247-249.
- Geissman, T. A. (1963). **Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds.** In M. Florkin and E. H. Stotz (Ed.), **Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents.** Vol. 9. Elsevier, New York. p. 265.
- Ghannoum, M. A. (1988). Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). **J. Gen. Microbiol.** 134: 2917-2924.
- Gottlieb, O. R. & Borin, M. R. (2002). Quantitative Chemobiology: A Guide into the Understanding of Plant Bioactivity. **J. Braz. Chem Soc.** 13: 772 -776.
- Hancock, R. E. W. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. **Trends Microbiol.** 5:37–42.
- Hayder, N.; Kilani, S.; Abdelwahed, A.; Mahmoud, A.; Meftahi, K.; Ben Chibani, J.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L. (2003). Antimutagenic activity of aqueous extracts and essential oil isolated from *Myrtus communis*. **Pharmazie** 58: 523-534.

- Hayes, A. J. & Markovic, B. (2002). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. **Food Chem. Toxicol.** 40: 535-543.
- Hennebelle, T., Sahpaz, S., Dermont, C., Joseph, H., Bailleu, F. (2006). The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French over-seas departments and review of previous works. **Chem. Biodivers.** 3: 1116-1125.
- Heinzmann, M. B. & Barros, F. M. C. (2007). Potencial das Plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de Fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Verbenaceae). **Saúde, Santa Maria.** 33. 43-48.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L.G. M., Von Wright, A. (1998). Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram- Negative Bacteria. **J. Agric. Food Chem.** 46: 3590-3595.
- Hernández, T.; Canales, M.; Avila, J. G.; Duran, A.; Caballero, J.; Romo, A.; Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine Zapolitán de las Salinas, Puebla (México). **J. Ethnopharmacol.** 88: 181-188.
- Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R. (2002). Screening of some plants used in the brasilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 97: 1027-1031.
- Hulin, V.; Mathot, A.; Mafart, P.; Dufossé, L. (1998). Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. **Sci. Aliments.** 18: 563-582.
- Ieven, M.; Vlietinck, A. J.; Vanden Berghie, D. A.; Totte, J. (1982). Plant antiviral agents. 3. Isolation of alkaloids from *Clivia miniata* Regal (Amaryllidaceae). **J. Nat. Prod.** 45: 564-573.

- Janssen, M. A.; Scheffer, J. J. C.; Parhan-Van Atten, A. W.; Svendsen, A. B. (1988). Screening of some essential oils for their activities on dermatophytes. **Pharm Weekblad.** (Scientific Edition). 10: 277-280.
- Jerkovic, I.; Mastelic, J.; Milos, M. (2001). The impact of both the sason of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare*. L.spp.Hirtum grown wild in Croatia. **Int. J. Food Sci. Technol.** 36: 649-654.
- Jitoe, A.; Masuda, T.; Tengah, I. G. P.; Suprpta, D. N.; Gara, I. W.; Nakatani, N. (1992). Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. **J. Agric. Food Chem.** 40: 1337-1340.
- Julião, L. S.; Tavares, E. S.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G. (2003). Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br (erva-cidreira). Rev. Bras. Farmacognosia In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia. **Resumos.** p 165. Curitiba, 2000.
- King, A. & Dickinson, R. (2000). Biotranformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. **Yeast** 16: 499-506.
- Lachowicz, K. J.; Jones, G. P.; Brigss, D. R.; Bienvenu, F. E.; Wan, J.; Wilcock, A.; Coventry, M. J. (1998). The synergistic preservative effectes of the essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Lett. Appl. Microbiol.** 26: 209-214.
- Lacoste E.; Chaumont J. P.; Mandin D.; Plumel, M. M.; Matos, F. J. (1996). Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Ann. Pharm. Fr.** 54: 228-230.
- Lambert, R. J. W. (2000). Susceptibility testing: inoculum size dependency of inhibition using the Colworth MIC technique. **J. Appl. Microbiol.** 89: 275:279.

- Lambert, R. J. W.; Sjandamis, P. N.; Coote, P. J. and Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J. Appl. Microbiol.** 91: 453-462.
- Laxoste, E.; Mandim, D.; Chaumont, J. P.; Plumel, M. M.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A. (1994). **XII Simpósio de Plantas medicinais Brasileiras**. Fortaleza, Brasil.
- Lawless, J. (1995) *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*. Shaftesbury, UK: **Element Books Ltd.**
- Leal, L. K. A. M.; Oliveira, V. M.; Araruna S. M.; Miranda M. C. C.; Oliveira, F. M. A. (2003). Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. **Rev. Bras. Farmacogn.** 13: 9-11.
- Lemos, T. L. G.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; McChesney, J. D. (1990). Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. **Phytother Rev.** 4: 82-84.
- Lima, E. O.; Gomes, S. T. A.; Oliveira, N. M. C.; Moraes, V. F.; Paulo, M. Q.; Carvalho, M. L.; Araújo, V. C. (1994). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **XII Simpósio de Plantas Medicinais Brasileiras**. Fortaleza, Brasil.
- Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias N. M. P.; Souza, E. L. (2006a). Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 197-201.
- Lima, M. R. F.; Ximenes, C. P. A.; Luna, J. S.; Sant'Ana, A. E. G. (2006b). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 300-306.

- Lis-Balchim, M. & Deans, S. G. (1997). Bioactivity of selected plant oils against *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Microbiol.** 82: 759-762.
- Lorenzi, H. & Matos, J. A. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Inst Plantarum Estudos Flora**. São Paulo. 512p.
- Lorenzo, D. Paz, D.; Davies, P.; Villar, R.; Canigueral, S.; Delacassa, E. (2001). Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E: Brown from Uruguay. **Flav. Frag. Journal.** 16: 356- 359.
- Magwa, M. L., Gundidza, M., Gweru, N., Humphrey, G. (2006). Chemical composition and biological activities of essential oil from the leaves of *Sesuvium portulacastrum*. **J. Ethnopharmacol.** 103:85-89.
- Maia, J. G. S.; Zoghbi, M. G. B.; Andrade, E. H. A. (2001). Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. **Museu Paraense Emilio Goeldi**.
- Mallavarapu, G. R.; Bahl, J. R.; Bansal, R. P.; Garg, S. N.; Ramish, S.; Kumar, S. (2000). Essential oil of *Lippia alba*, a rich source of linalol. **J. Med. Arom. Plant Sci.** 22: 765-767.
- Manica-Cattani, M. F.; Zacaria, J.; Pauletti, G.; Atti-Serafini, L.; Echeverrigaray, S. (2009). Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Braz. J. Biol.** 69: 375-380.
- Martins, E. R.; Castro, D. M.; Castellani, D. C.; Dias, J. E. (2002). Plantas medicinais, **Ed. UFV: Viçosa**.
- Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W. (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brasil. **J. Essent. Oil Res.** 8: 695-698

- Matos, F. J. A. (1996). As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farm.** 77: 137-141.
- Matos, F. J. R. (1998). Farmácias Vivas. EUFC. ed. Rev. e atual, 1-220.
- Matos, F. J. A. & Oliveira, F. (1998). *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Rev. Bras. Farm.** 79: 84-87.
- Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; Silva, M. G. V. (1999). Medicinal plants northeast Brazil containing Thymol and Carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *L.gracilis* H. B. K (Verbenaceae). **J. Essent. Oil Res.** 11: 666-668.
- Mendes, M. M. F. S (2001). Caracterização morfo-anatomica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill) E. Br. Ex Britt e Wilson. **Defesa de Doutorado.** Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, Brasil.
- Mesa-Arango, A. C.; Montiel-Ramos, J.; Zapata, B.; Duran, C.; Betancur-Galvis, L.; Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 104: 878-884.
- Michelin, D. C.; Moreschi, P. E.; Lima, A. C.; Nascimento, G. G. F.; Paganelli, M. O.; Chaud, M. V. (2005). Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.** 15: 316-320.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N. (2004) Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essencial oil. **J. Agric. Food Chem.** 52: 2485-2489.
- Mishra, A. K. & Dubey, N. K. (1994). Evaluation of some essential oils for their

toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 1101–1105.

Nascimento, G. G. F.; Locatelli, J.; Freitas, P. C. *et al.* (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** 31: 247-56.

Nascimento, P. F. C.; Nascimento, A. C.; Rodrigues, C. S. R.; Antonioli, A. R.; Santos, O. P.; Barbosa-Junior, A. M.; Trindade, R. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev. Bras. Farmacogn.** 17: 108-113.

Oliveira, A. C. (2000). Atividade de óleos essenciais e exsudatos de plantas sobre espécies fúngicas isoladas de frutas in natura. **Dissertação de mestrado.** Ciência e Tecnologia de alimentos. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, Brasil.

Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Vieira, W. L.; Freire, K. R. L.; Trajano, V. N.; Lima, I. O.; Souza, E. L.; Toledo, M. S.; Silva-Filho, R. N. (2006). Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 77-82.

Oliveira, D. R.; Leitão, G. C.; Santos, S. S.; Bizzo, D. H. R.; Lopes, D.; Alviano, C. S.; Alviano, D. S.; Leitão, S. G. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. **J. Ethnopharmacol.** 108: 103-108.

Ouattara, B.; Simard, R. E.; Holley, R. A.; Pierre, G. J.; Bégin. (1997). A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **Int. J. Food. Microbiol.** 37: 155-162.

Pascual, E. M.; Slowing, K.; Carretero, M. E.; Sánchez Mata, D.; Villar, A. (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.** 76: 201-214.

- Pereira, R. S.; Sumita, T. C.; Furlan, M. R.; Jorge, A. O. C.; Ueno, M. (2004). Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Rev. Saúde Pública.** 38 (2).
- Péret-Almeida, L.; Naghetini, C. C.; Nunan, E. A.; Glória, M. B. A. Atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Curcuma longa* L. **II Simpósio em Ciência de Alimentos.** SIMPOCAL/SBCTA. Florianópolis, SC, 28 a 30 de maio de 2003 (Pôster).
- Péret-Almeida. (2006). *Curcuma longa* L. – Separação e caracterização de pigmentos curcuminóides, avaliação da atividade antimicrobiana, cultivo *in vitro* para o estabelecimento de gemas, calos, órgãos (raízes) e produção de metabólitos secundários. **Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos.** Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, Brasil.
- Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A. G.; Pinto, E.; Oliveira, S. C.; Tavares, C.; Salgueiro, L. Cavaleiro, C.; Gonçalves, M. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** 18, 73-78.
- Pino, J. A. & Ortega, A. (1996). Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Cuba. **J. Essent. Oil Res.** 8: 445-446.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A., Harvala, C. (2003) Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.** 51: 3294-3301.
- Pontes, Z. B. V. S. (2002). Atividade antifúngica de produtos naturais e sintéticos sobre espécies de *Trichosporon Behrend*. João Pessoa, 173p. **Tese de Doutorado.** Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Universidade Federal da Paraíba.

- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Compl Alternative Medicine**. 6:39. (<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/39>)
- Rao, G. P. (2000). Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill). **Ind. J. Chem. Tech.** 7: 332.
- Rassoli, I. & Mirmostafa, S. A. (2003). Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus Kotschyanus* and *Thymus persicus*. **J. Agric. Food Chem.** 51: 2200-2205.
- Rates, S. M. K. (2001). Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.** 11: 57-69.
- Reynolds, J. E. F. (1996). Martindale – the Extra Pharmacopoeia 31st edn. London: **Royal Pharmaceutical Society of Great Britain.**
- Romerio, E.; Tateo, F.; Debiaggi, M. (1989). Antiviral activity of *Rosmarinus officinalis* L. extract. **Mit. Dem. Geb. Leb. Mittel. Untersuchung Hygiene**. 80: 113-119.
- Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M.; Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, anti radicals and antimicrobials in foods. **Food Chem.** 91: 621-632.
- Salvagnini, L. E.; Oliveira, J. R. S.; Santos, L. E.; Moreira, R. R. D.; Pietro, R. C. L. R. (2008). Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). . **Rev. Bras. Farmacogn.** 18: 241-244.
- Sandri, I. G.(2004). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas da família *Lamiaceae* sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.

- Sandri, I. G.; Zacaria, J.; Fracaro, F.; Delamare, A. P. L.; Echeverrigaray, S. (2007). Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chem.** 103: 823-828.
- Schultes, R. E. (1978). The kingdom of plants, p. 208. In W. A. R. Thomson (ed.), *Medicines from the Earth*. **McGraw-Hill Book Co.** New York, N.Y.
- Senatore, F. & Rigano, D. (2001). Essential oil of two *Lippia* spp (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **J. Flavour Fragr.** 16: 169-171.
- Shale T. L., Stirk W. A., Van Staden J. (1999). Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **J. Ethnopharmacol.** 67: 347-354.
- Siani, A. C.; Sampaio, A. L. F.; Souza, M. G.; Henriques, M. G. M. O.; Ramos, M. F. S. (2000). Óleos essenciais. **Biotec. Ciência Desenvolvimento.** 16: 38-43.
- Sharma, N. & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis*. Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) **Van. Tieghem. Microbial.** 163: 337-344.
- Sikkema, J. J. A. M. & Poolman, B. (1994). Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **J. Biol. Chem.** 269: 8022-8028.
- Sikkema, J. J. A. M. & Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbial.** 59: 201- 222.
- Silva, J. S.; Moura, M. D.; Oliveira, R. A. G.; Diniz, M. F. F. M.; Barbosa- Filho, J. M. (2003). Natural products inhibitors of ovarian neoplasia. **Phytomedicine.** 10: 221-232.
- Silva, N. A.; Oliveira, F. F.; Costa, L. C. B.; Bizzo. H. R.; Oliveira, R.A. (2006). Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Rev. Bras. Pl. Med.** 8: 52-55.

- Silva-Santos, A.; Antunes, A. M. S.; Bizzo, H. R.; D'Avila, C. A.; Souza- Santos, L. C. (2004). The application of essential oils and terpenics/terpenoids compounds in the fields of pharmaceutic and cosmetic through the knowledge registered in patents. **Rev. Bras. Farmacogn.** 14: 48-50.
- Simionatto, E., Porto, C., Stüker, C.Z., Dalcol, I.I., Silva, U. F. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* Mart. Ex Spreng. **Quim. Nova.** 30: 1923-1925.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (2003). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC.
- Singh, G.; Singh, O. P.; Maurya, S. (2002a). Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian curcuma species. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials. **Current Sci.** 45: 75-81.
- Singh, R.; Chandra, R.; Bose, M.; Luthra, P. M. (2002b). Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. **Current Sci.** 83: 737-740
- Smid, E. J.; Koeken, P. G.; Gorris, L. G. M. (1996). **Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone.** In: Lyr H., Russell P.E., Sisler H.D. (Ed) **Modern Fungicides and Antimicrobial Compounds.** Intercept: Andover, U.K. pp 173-180.
- Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett. Appl. Microbiol** 26: 118-122.
- Svoboda, K. P. & Deans, S. G. (1995). Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. **Acta Hortic.** 390: 203-209.

- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. **Rev. Acad. Colomb. Cien.** 27: 579.
- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martinez, J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **J. Chromatog.** 1025: 93-103
- Tavares, E. S.; Julião, E. S.; Lopes, H. D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G. (2005). Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev. Bras. Farmacogn.** 15:1-5.
- Tavares, A.C.; Gonçalves, M.J.; Calaleiro, C.; Cruz, M.T.; Lopes, M.C.; Canhoto, J.; Salgueiro, L.R. (2008). Essential oil of *Dacus carota* subsp. *halophilus*: composition, antifungal activity and cytotoxicity. **J. Ethnopharmacol.** 119: 129-134.
- Terblanché, F. C. & Kornelius, G. (1996). Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): a literature review. **J. Essent. Oil Res.** 8: 471-485.
- Tharib, S. M.; Gnan, S. O.; Veitch, G. B. A. (1983). Antimicrobial activity of compounds from *Artemisia campestris*. **J. Food Protect.** 46:185-187.
- Trombetta, D; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **J. Antimicrob. Agents Chemoth.** 2474-2478.
- Ultee, A.; Kets, E. P. W.; Smid, E. J. (1999) Mechanisms of action of Carvacol on the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 4606-4610

- Ultee, A.; Slump, R. A.; Steging, G.; Smid, J. (2000). Antibacterial activity of carvacol towards *Bacillus cereus* on rice. **J. Food Protection.** 63: 620-624
- Vale, T. G. (1999). Estudo farmacológico comparativo de óleos essenciais de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal do Ceará. Ceará, Brasil.
- Vale, G. T.; Furtado, E. C.; Santos, G. J.; Viana, G. S. B. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Phytomedicine.** 9: 709-714.
- Valero, M. & Salmerón, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **Int. J. Food Microbiol.** 85:73-81.
- Ventrella, M. C. (2000). Produção de folhas, óleo essencial e anatomia foliar quantitativa de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br (Verbenaceae) em diferentes níveis de sombreamento e épocas de colheita. **Tese de doutorado.** Universidade Estadual Paulista, Brasil.
- Viana, G. S. B.; Vale, T. G.; Rao, V. S. N.; Matos, F. J. A. (1998). Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: a comparative study. **Pharm. Biology.** 36: 1-5.
- Zaika, L. L.; Kissinger, J. C.; Wasserman, A. E. (1983). Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. **J. Food Science.** 48: 1455-1439.
- Zoghbi, M. G. B.; Andrade, E. H. A.; Santos, A. S.; Silva, M. H. L.; Maia, J. G. S. (1998). Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Grown wild in Brazilian Amazon. **J. Flavour. Fragr.** 13: 47-48.