

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS FRENTE A ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALGUMAS PLANTAS DO NORDESTE DO BRASIL

LUCIANA MEDEIROS BERTINI¹
ALEXSANDRA FERNANDES PEREIRA¹
CARLA LOANE DE LIMA OLIVEIRA¹
EVERARDO ALBUQUERQUE MENEZES²
SELENE MAIA DE MORAIS³
FRANCISCO AFRÂNIO CUNHA⁴
EVELINE SOLON BARREIRA CAVALCANTI⁵

1. Graduandos do curso de Química da Universidade Estadual do Ceará.
 2. Professor adjunto de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará DACT/FFOE/UFC.
 3. Professora titular de Química do Departamento de Física e Química da Universidade Estadual do Ceará (UECE)
 4. Mestrando em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).
 5. Professor adjunto de Química do Departamento de Física e Química da Universidade Estadual do Ceará (UECE).
- Autor responsável: E.A. Menezes. E-mail Menezes@ufc.br

INTRODUÇÃO

Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza geralmente o único recurso terapêutico. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo, quanto a espécie humana. Nos dias atuais, nas regiões mais pobres do País e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais.²²

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem, de forma relevante, para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática de consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.²²

De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial.²²

Óleos essenciais de plantas apresentam uma atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos.^{6,7} A composição química de óleos essenciais depende do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação.²² Eles podem apresentar ação tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e ainda leveduras e fungos filamentosos.³⁶ Ainda que indústrias farmacêuticas venham produzindo um número de novos antibióticos nas últimas três décadas, tem aumentado a resistência de microrganismos para essas drogas.²⁸ Em geral, bactérias tem uma habilidade genética para transmitir e adquirir resistência para essas drogas, que são utilizadas como agentes terapêuticos.¹⁰

Atividade antibacteriana depende do tipo, composição e concentração da espécie ou o óleo essencial, o tipo do

microrganismo em questão, a composição do substrato, o processamento e a condição de estocagem.²³

O problema da resistência microbiana está aumentando e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda indecisa.³⁶ Portanto, ações devem ser tomadas para reduzir esse problema, por exemplo, para controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para a melhor compreensão do mecanismo genético de resistência, e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais.³⁶

Durante um longo período de tempo, plantas tem sido avaliadas como fonte de produtos naturais para conservar a saúde humana, especialmente nas últimas décadas, com estudos intensivos para terapia natural.³⁶ A propósito, o uso de componentes das plantas na área farmacêutica tem gradualmente aumentado no Brasil. De acordo com Organização Mundial de Saúde, plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte de obter-se uma variedade de drogas.³⁶

MATERIAL E MÉTODO

Extração do óleo essencial

Os óleos essenciais foram obtidos pelo método de destilação por arraste com vapor d'água.

Análise química do óleo essencial

Os óleos essenciais foram analisados por CG/MS (Cromatografia Gasosa/ Espectroscopia de Massa) com um instrumento Hewlett - Packard 5971 CG/MS equipado com uma coluna capilar de sílica fundida de dimetilpolisiloxano DB-5 (30mm x 0,25 mm espessura do filme) e carregado com gás Hélio com um fluxo de 1µL/min e temperatura programada de 35° C - 180° C na velocidade de 4° C/min e 180° C - 280° C na velocidade de 20° C/min.

O injetor e detector foram mantidos a 250°C e 200°C, respectivamente. A identificação dos constituintes foi realizada por base na computação das referências constituídas do programa do aparelho, com índice de retenção e interpretação visual do espectro de massa.²

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foram analisadas pelo método de Difusão Cavidade Placa em Ágar e Microdiluição em Caldo.^{16,26}

Difusão Cavidade Placa Ágar

Neste método, foram utilizadas placas de Ágar Mueller-Hinton, onde foram realizados orifícios com 5mm de diâmetro e 4mm de profundidade e, em seguida, semeadas as bactérias por toda a placa com "swab" estéreis. Nos orifícios, foram colocados os óleos essenciais nos volumes de 10uL e 20uL. Para cada bactéria, foi utilizado um antibiótico específico, no centro da placa, como controle positivo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi verificada a presença de halos ao redor dos orifícios e medidos os diâmetros dos halos com auxílio de um paquímetro.^{16,26}

Microdiluição em caldo

Este teste foi realizado em placas de Elisa. Foram feitas suspensões das bactérias em meio BHI e ajustada a 0,5 na escala de McFarland. As placas de Elisa antes da realização dos testes, foram esterilizadas com hipoclorito 5% durante 24 horas e logo após lavadas com água autoclavada e submetidas a luz UV durante 30 minutos.

As placas de Elisa são compostas de 84 orifícios, cada um identificado por um número e uma letra. No orifício 1ª, foi colocada BHI e o inóculo para a realização do controle positivo; no orifício 10ª, foi colocada BHI e água autoclavada; e no 12ª, BHI foi colocado o inóculo e antibiótico.

Nos demais orifícios, foram colocados BHI, inóculo e óleo nas concentrações de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% e 40%. Em seguida, cada placa foi coberta com parafilm e acondicionada em uma bolsa plástica. As amostras foram incubadas a 35-37°C por 24 horas. Os resultados foram observados no microscópio na objetiva 10x e comparados com os orifícios controle.^{16,26} Esse método permite a detecção do CIM (Concentração Inibitória Mínima), que é a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano.

RESULTADOS

Estrutura dos principais constituintes

L. sidoides



Figura 1: Timol

C. citratus



Figura 2: Neral (Z-Citral)

C. citratus



Figura 3: Geranial (E-Citral)

C. zehntneri

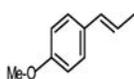


Figura 4: Trans-anetol

C. sonderianus (23/07/02)



Figura 5: beta-Felandreno

C. sonderianus (23/07/02)

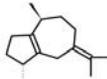


Figura 6: Trans-beta-Guaieno

C. sonderianus (01/05/03)

C. sonderianus (01/05/03)

C. argyrophyloides

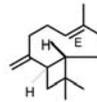


Figura 7: E-Cariofileno

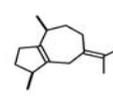


Figura 8: Cis-beta-Guaieno
C. argyrophyloides

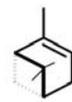


Figura 9: alpha-Pineno

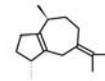


Figura 10: Trans-beta-Guaieno

Método Cavidade Placa Ágar - Leitura com 24 horas

TABELA 1: Atividade dos óleos essenciais na concentração de 10µL

Óleo Essencial	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. sidoides</i>	28,0 ± 2,8 ^a	*	13,5 ± 3,5 ^a
<i>C. citratus</i>	16,5 ± 0,7 ^a	11,0 ± 0,0 ^a	12,0 ± 0,0 ^a
<i>C. sonderianus</i> 23/07/02	7,5 ± 0,7 ^a	*	*
<i>C. sonderianus</i> 01/05/03	*	*	*
<i>C. argyrophyloides</i>	15,0 ± 1,4 ^a	9,0 ± 1,4 ^a	9,5 ± 0,7 ^a
<i>C. zehntneri</i>	*	*	*
Antibiótico	OXACILINA ^b	18 mm	
	CEFTAZIDIMA ^c		*
	CIPROFLOXACINA ^d		34 mm

(*) ausência de halos
a: os halos foram medidos em mm. média ± desvio padrão.
b: antibiótico utilizado na literatura para *S. aureus*.
c: antibiótico utilizado na literatura para *P. aeruginosa*.
d: antibiótico utilizado na literatura para *E. coli*.

TABELA 2: Atividade dos óleos essenciais na concentração de 20 µL

Óleo Essencial	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>L. sidoides</i>	33,5 ± 0,7 ^a	*	23,0 ± 0,0 ^a
<i>C. citratus</i>	19,5 ± 0,7 ^a	11,0 ± 0,0 ^a	15,5 ± 0,7 ^a
<i>C. sonderianus</i> 23/07/03	11,5 ± 0,7 ^a	*	*
<i>C. sonderianus</i> 01/05/03	7,5 ± 0,7 ^a	*	*
<i>C. argyrophyloides</i>	14,0 ± 0,0 ^a	9,0 ± 0,0 ^a	10,0 ± 1,4 ^a
<i>C. zehntneri</i>	*	*	*
Antibiótico	OXACILINA ^b	14mm	
	CEFTAZIDIMA ^c		*
	CIPROFLOXACINA ^d		33mm

(*) ausência de halos
a: os halos foram medidos em mm. média ± desvio padrão.
b: antibiótico utilizado na literatura para *S. aureus*.
c: antibiótico utilizado na literatura para *P. aeruginosa*.
d: antibiótico utilizado na literatura para *E. coli*.

TABELA 3: Determinação da Concentração Inibitória (CI) de óleos essenciais

TABELA 3: Determinação da Concentração Inibitória (CI) de óleos essenciais

Óleo Essencial	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. argyrophyloides</i>	CI < 5%	NT	CI < 5%
<i>C. sonderianus</i> 23/07/02	15% < CI < 20%	NT	NT
<i>C. sonderianus</i> 01/05/03	CI > 40%	NT	NT
<i>C. citratus</i>	CI < 5%	CI < 5%	15% < CI < 20%
<i>L. sidoides</i>	CI < 5%	NT	CI < 5%

NT: não testado.

Estudos indicam que óleos essenciais têm efeito bactericida contra muitas bactérias.^{17,29} Segundo OHNO *et al*, 2003, há diferenças na atividade bactericida entre os óleos essenciais, embora a razão exata ainda não tenha sido esclarecida. Esses achados concordam com os encontrados em nosso estudo.

Segundo KOYAMA *et al*, 1997, muitos componentes dos óleos essenciais, os quais são diferentes em cada óleo essencial, tem a habilidade para romper ou penetrar na estrutura lipídica presente em bactérias Gram-negativas.

Segundo OHNO *et al*, 2003, é necessário examinar separadamente cada componente do óleo essencial, e a combinação para averiguar se eles tem ação bactericida sozinhos ou sincronizados.

Dentre todos os óleos testados, observou-se que o mais ativo foi o *C. citratus* o qual apresentou atividade contra as três bactérias, seguido do *C. argyrophyloides*, *C. sonderianus* (23/07/02), *L. sidoides*, *C. sonderianus* (01/05/03) e por fim o *C. zehntneri*, o qual não apresentou nenhuma atividade contra as bactérias (Tabelas 1 e 2).

Segundo CARRICONDE *et al*, 1996, o óleo essencial do *C. citratus* tem como propriedades terapêuticas ação antifúngica e antibacteriana. O principal componente do óleo essencial do *C. citratus* é o citral. Como constituintes de maior ocorrência na espécie estão o citral, mirceno, limoneno, nonanal, nerol, geraniol, decanal, linalol, acetato de geranila e terpineol.^{1,6,14}

Segundo BATT *et al*, 1983, citral é um terpenóide oxigenado (aldeído), que tem sido identificado como componente exibidor das propriedades antifúngicas do óleo do *C. citratus*. Tanto o citral a e b foram identificados como componentes fungicidas.³⁵ Segundo ONAWUNMI *et al*, 1984, estudando a atividade antibacteriana dos constituintes do óleo essencial do *C. citratus*, constatou que ambos α - citral e β - citral foram ativos contra 3 organismos testados, dentre eles *E. coli* e *S. aureus*, comparando os resultados dos constituintes isolados com os resultados do óleo puro. *E. coli* foi mais resistente do que o *S. aureus*. Os resultados encontrados em nosso estudo estão em concordância com esses resultados (Tabela 3).

Segundo OLOJEDE *et al*, 1993, devido à capacidade do óleo essencial do *C. citratus* como antimicrobiano, este pode ser explorado como um método alternativo na preservação de comida industrializada, pois segundo MISHRA & DUBEY, 1994, o *C. citratus* é extremamente distribuído e não-fitotóxico.

O *C. argyrophyloides* de acordo com o seu espectro de massa constatou-se que dentre os seus 20 constituintes, os presentes em uma maior porcentagem são: *alfa*-pineno (20,96%), *beta-trans*-guaieno (15,97%) e *beta* pineno (9,55%). Observou-se que este óleo apresentou atividade contra as três bactérias inclusive a *P. aeruginosa* que mostrou-se altamente resistente ao antibiótico ceftazidima o qual é utilizado como padrão para tratamento da mesma (Tabela 2).

O óleo essencial do *C. argyrophyloides* apresentou um CI < 5% para *S. aureus* e *E. coli* o que é um fator importante para a produção de um fármaco que combata danos causados pelas mesmas, o que ainda seria viável, devido a fácil disponibilidade da planta pois a mesma é característica do Nordeste Brasileiro.

Neste estudo foi realizada a análise em dois diferentes horários e períodos de coleta do *C. sonderianus*. Constatou-se

que o *C. sonderianus* coletado no dia 23/07/02 às 5:30h mostrou-se mais eficiente do que o *C. sonderianus* coletado no dia 01/05/03 às 6:00h. Comparando os dois espectros de massa, observa-se uma certa similaridade, no entanto os constituintes em maior porcentagem no *C. sonderianus* do dia 23/07/02 são: *beta*-felandreno(18,21%), *trans-beta*-guaieno(16,5%) e *alfa* pineno(10,49%), enquanto que o *C. sonderianus* do dia 01/05/03 seus principais constituintes são: *beta-cis*-guaieno (15,92%), E- cariofileno (16,21%) e *beta*-felandreno (15,23%).

Ao observar o método de Microdiluição em caldo, verifica-se que o *C. sonderianus* (23/07/02) requer uma quantidade de óleo inferior ao *C. sonderianus* (01/05/03) para inibir o crescimento de *S. aureus* de acordo com a Tabela 3, o que evidencia a sua maior eficiência contra a bactéria em estudo, e ambos os óleos não apresentaram nenhuma atividade contra as demais bactérias.

O *C. zehntneri* não apresentou nenhuma atividade contra as bactérias estudadas. Nos constituintes deste óleo observa-se que seu principal constituinte é o *trans*-anetol (94,09%), os demais constituintes desse óleo possuem teor inferior a 1,96%. Apesar de não apresentar nenhuma atividade contra as três bactérias estudadas em estudos realizados posteriormente constatou-se que este óleo é um excelente antifúngico contra *Candida albicans*, que é um fungo que causa micoses principalmente em pacientes com AIDS.

O principal constituinte da *Lippia sidoides* é o timol, um potente anti-séptico do grupo fenol. Timol tem uma forte atividade contra bactérias e fungos e é responsável pelo cheiro característico da *L. sidoides* [24]. A eficácia dessa planta tradicional foi demonstrada pelo óleo essencial das folhas, que contem timol e carvacrol como principais constituintes, e mostrou atividades bactericida e fungicida.^{20,21} No presente trabalho a única bactéria resistente a *L. sidoides* foi a *P. aeruginosa*, as demais apresentaram-se sensíveis com um CI inferior a 5%.

Segundo NASCIMENTO *et al*, 2000, o uso de plantas para curar doenças, incluindo doenças infecciosas, tem sido extensivamente aplicada pelas pessoas, informações da literatura e os seus resultados revelam um grande potencial das plantas para tratamentos terapêuticos, apesar do fato que elas não tenham sido completamente estudadas, mais estudos precisam ser conduzidos para pesquisar sobre novos componentes. Uma vez extraídos, e antes de serem usados como tratamento terapêutico, eles devem ter a toxicidade testadas *in vivo*. Testes têm demonstrado a toxicidade de extratos de diferentes plantas.¹⁵

Segundo KUBO *et al*. 1993, a atividade antimicrobiana tem sido encontrada com alguns terpenos originados de plantas. Segundo EBANA *et al*, 1991, taninos, aldeídos, saponinos e glicosídeos cardíacos encontrados em plantas têm também sido associados com atividade antimicrobiana.

O estudo das plantas medicinais, como ficaram conhecidas, no mundo todo, pelos pesquisadores, está sendo desenvolvido, comprovando as enormes qualidades medicinais das plantas, sejam de outros países, ou das milhares de espécies espalhadas pelos quatro cantos do País e em outras partes do mundo, que, ao mesmo tempo em que vêm ganhando respeito e maior espaço nas prateleiras de farmácias e casas especializadas do mundo inteiro, as plantas medicinais também vêm apresentando propriedades nunca antes exploradas.

A grande incidência de infecções, principalmente em indivíduos imunocomprometidos, aumenta a importância da procura e descoberta de compostos terapêuticos alternativos.

CONCLUSÃO

A atividade antibacteriana dos óleos testados nesse respectivo trabalho pode abrir perspectivas, no sentido de desenvolver um fitoterápico eficaz e de baixo custo, podendo ser usado no tratamento de doenças infecciosas causadas por microrganismos resistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABEGAZ, B., YOHANNES, P.G. Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citratus* Stapf. *J. of Nat. Prod.* v. 46, p. 424-426, 1983.
2. ADAMS, R. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing, Carol Stream, IL. 2001.
3. BATT, C., SOLBERG, M. & CEPONIS, M. Effect of volatile components of carrot seed oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Sci.* v. 48, p. 762-768, 1983.
4. CARLINI, E.A. ; CONTAR, J. P.; SILVA – FILHO, A. R.; DA SILVEIRA FILHO, N. G.; FRONCHTENGARTEN, M. L. & BUENO, O . F. A . Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Staf.) 1: Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* v.17 p.37-64, 1986.
5. CARRICONDE, C.; MORES, D.; VON FRITSCHEN, M.; CARDOZO JUNIOR, E. L. Plantas medicinais e alimentícias. Olinda: Centro Nordestino de Medicina Popular; Universidade Federal Rural de Pernambuco. v.1, p.45-47, 1996.
6. CARSON, C. F.; COOKSON, B. D.; FARRELLY, H. D.; RILEY, T. V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 35, p. 421-424, 1995.
7. CARSON, C.F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Bacteriol.* v. 78, p. 264-269, 1995.
8. CARVALHO, F. C.; ARAÚJO, J. A . F; GARCIA, R.; PEREIRA, J. M. F; ALBUQUERQUE, V. M. Efeito do Corte da Parte Aérea na Sobrevivência do Marmeleiro (*Croton Sonderianus* Muell. Arg.) *Rev. Bras. Zootec.* v. 30, p. 930-934, 2001.
9. CHANH, P. H. ; KOFFI, Y.; CHANH, A . P. H. *Planta Med.* v. 4, p.294-296, 1988.
10. COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. *Science.* v. 257,p.1050-1055, 1992.
11. COSTA, S. M. O.; LEMOS, T. L. G. ; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MONTENEGRO, R. C.; BRAZ-FILHO; R. Chemical Constituents from *Lippia sidoides* and Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.* v. 64, p. 792-795, 2001.
12. CRAVEIRO, A . A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C.H.S, MATOS, F. J. A . & ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciência e Cultura.* v. 29, p. 445, 1977.
13. EBANA, R. U. B., MADUNAGU, B. E., EKPE, E. D. & OTUNG, W. I. Microbiological exploitation of cardiac glycosides and alkaloids from *Garcinia kola*. *Borreria ocymoides*, *Kolanidita* and *Citrus aurantifolia*. *J. Appl. Bacteriol.* v. 71, p. 398-401, 1991.
14. EL FATTAH, M. A.; EL ZAHWEY; HARIDY, I.M.; EL DEEB, S.A. Effect of drying on the physicochemical properties and composition of lemongrass oil. *Menofiya. J. Agric. Res.* v. 17, p. 1211-1230, 1992.
15. IZZO, A. A., Di CARLO, G., BISCARDI, D. , FUSCO, R., MASCOLO, N., BORRELLI, F. CAPASSO, F., FASULO, M. P., AUTORE, G. Biological screening of Italian medicinal plants for antibacterial activity. *Phytother. Res.* v. 9, p. 281-286, 1995.
16. JORGENSE, J.H., TURNIOGE, J.D., WASHINGTON, J.A. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disc Diffusion Methods. in: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENDUER, F.C., YOLKEN, R.H. Manual of Clinical Microbiology. cap. 118. Section VIII. p. 1526-1543. 7th edition. ASM Press., 1999.
17. KALPOUTZAKIS, E., ALIGIANNIS, N., MENTIS, A., MITAKU, S., CHARVALA, C. Composition of the essential oil of two nepeta species and in vitro evaluation of their activity against *Helicobacter pylori*. *Planta Med.* v. 67, p. 880- 883, 2001.
18. KOYAMA, S., YAMAGUCHI, Y., TANAKA, S., MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kiso-hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. *General Pharmacol.* v. 28, p. 797-804, 1997.
19. KUBO, I., MUROI, H. & HIMEJIMA, M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *J. Agric. Food Chem.* v.41, p.107-111, 1993.
20. LACOSTE, E.; CHAUMONT, J.P.; MANDIN, D.; PLUMEL, M.M.; MATOS, F. J. A. *Ann Pharm. Fr.* v. 54, p. 228-230, 1996.
21. LEMOS, T. L. G.; MATOS, F.J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; CLARK, A.M.; McCHESNEY, J. D. *Phytother. Res.* v. 4, p. 82-84, 1990.
22. MACIEL, M. A. M.; PINTO, A . C.; VEIGA, V. F.Jr.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova.* v.25, p.429-438, 2002.
23. MARINO, M.; BERSANI, C. & COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Inter. J. of Food Microb.* v. 67, p.187-195, 2001.
24. MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Rev. Bras. Farm.* v.79, p. 84-87, 1998.
25. MISHRA, A.K. & DUBEY, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Envir. Microbiol.* v. 60, p.1101-1105, 1994.
26. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M-A₃-NCCLS, 1997.
27. NAKAMURA, T.; OKAYAMA, E.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M.; NISHIBE, S.; DEYAMA, T. *Chem. Pharm. Bull.* v.45, p.499-504, 1997.
28. NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J. ; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microb.* v.31, p.247-256, 2000.
29. NENOFF, P., HAUSTEIN, U.F., BRANDT, W. Antifungal activity of the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against pathogenic fungi *in vitro*. *Skin Pharmacol.* v.9, p.388-394, 1996.
30. OHNO, T., KITA, M., YAMAOKA, Y., IMAMURA, S., YAMAMOTO, S. M., KODAMA, T., KASHIMA, K., IMANISHI, J. Antimicrobial Activity of Essential Oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* v.8, p.207-215, 2003.
31. OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C.F.; MORAIS, S.M.; COELHO-DE SOUZA, A . N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz. J. M. Biol. Res.* v.34, p.1471-1474, 2001.
32. OLOJEDE, F., ENGELHART, G., WALLNOFER, P. R. & ADEGOKE, G. O. Decrease of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* by spices. *World J. Microbiol. Biotechnol.* v.9, p. 605-606, 1993.
33. ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W. AB.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *J. Ethnopharmacol.* v.12, p.279-286, 1984.
34. OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil – na essential oil from *Ocimum basilicum* L. – against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *J. Microbiol. Meth.* v. 54, p.105-110, 2003.
35. PARANAGAMA, P.A.; ABEYSEKERA, K. H. T.; ABEYWICKRAMA, K.; NUGALIYADE, L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. *Let. in Applied Microbiol.* v.37, p.86-90, 2003.
36. PRASHAR, A.; HILLI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry.* v.63, p. 569-575, 2003.
- VIANA, G.S.B.; VALE, T.G.; PINHO, R.S.N.; MATOS, F.J.A. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J. Ethnopharmacol.* v.70, p.323-327, 2000.