



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria
Brasil

de Abreu Pereira, Alcilene; Hilsdorf Piccoli, Roberta; Nara Batista, Nádia; Gonçalves Camargo, Natália; Maciel Mattos de Oliveira, Máira
Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais
Ciência Rural, vol. 44, núm. 11, noviembre, 2014, pp. 2022-2028
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33132576019>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica* Enteritidis por óleos essenciais

Thermochemical inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Enteritidis by essential oils

Alcilene de Abreu Pereira^I Roberta Hilsdorf Piccoli^{II*} Nádia Nara Batista^{II}
Natália Gonçalves Camargos^{II} Máira Maciel Mattos de Oliveira^{III}

RESUMO

O controle do crescimento microbiano tanto na indústria de alimentos quanto em ambientes hospitalares é de extrema importância. Entretanto, observa-se aumento da resistência dos microrganismos aos desinfetantes mais empregados, observando-se a necessidade de estudos com novos antimicrobianos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e a curva de morte termoquímica de soluções desinfetantes de óleos essenciais sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis. Foram utilizados os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia caryophyllus* (cravo botão) e *Foeniculum vulgare* (funcho doce). As concentrações mínimas inibitórias foram determinadas utilizando-se a técnica de diluição em placas. As concentrações testadas foram de (%): 0,00; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; e 5,0. *Escherichia coli* foi a única bactéria sensível a todos os óleos em concentrações abaixo de 5%. Cravo da Índia não inibiu o crescimento de *S. aureus* nas concentrações testadas. Somente o óleo essencial de tomilho inibiu o crescimento de *Salmonella* Enteritidis. Observando-se as curvas de morte termoquímica de *S. aureus*, nota-se que a solução desinfetante contendo óleo essencial de tomilho foi a mais eficiente, tanto a 25 quanto a 40°C, sendo necessário apenas 10min. de contato para não serem mais detectadas células viáveis. A solução desinfetante contendo 0,25% de óleo essencial de tomilho, tanto a 25 quanto a 40°C, eliminou as células de *S. Enteritidis* após 10min. de contato. Já para *E. coli*, os melhores resultados foram obtidos com as soluções desinfetantes contendo óleos essenciais de funcho doce e cravo da Índia a 25 e 40°C e tomilho a 40°C. Todos os tratamentos, exceto aqueles contendo óleo essencial de cardamomo, reduziram o número de células viáveis das bactérias testadas em pelo menos 5 ciclos log, sendo considerados adequados para utilização como desinfetantes.

Palavras-chave: desinfetante, *Thymus vulgaris*, *Elettaria cardamomum*, *Eugenia caryophyllus*.

ABSTRACT

The control of microbial growth in the food industry and in hospital environments is extremely important. However there is increasing resistance of microorganisms to disinfectants normally applied, which leads to the need for new antimicrobial studies. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity and thermochemical death curve of disinfectant solutions from essential oils on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. The essential oils of *Thymus vulgaris* (thyme), *Elettaria cardamomum* (cardamom), *Eugenia caryophyllus* (clove bud) and *Foeniculum vulgare* dulce (sweet fennel) were used. The minimum inhibitory concentrations were determined using dilution technique in Petridish. The concentrations tested were (%): 0.00, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, and 5.0. *Escherichia coli* were the only bacteria sensitive to all oils at concentrations below 5%. Cloves did not inhibit the growth of *S. aureus* at the concentrations tested. Only the thyme essential oil inhibited the growth of *Salmonella* Enteritidis. Observing the thermochemical death curves of *S. aureus* one can see that the disinfectant solution containing thyme essential oil was the most effective, both at 25 and 40°C, requiring only 10min contact to no longer detect viable cells. The disinfectant solution containing 0.25% thyme essential oil, both at 25 and 40°C removed *S. Enteritidis* cells after 10min. contact. For *E. coli* the best results were obtained with disinfectant solutions containing fennel and sweet clove essential oils at 25 and 40°C and thyme at 40°C. All treatments, except that containing cardamom essential oil, reduce the number of viable bacteria cells tested in at least 5log cycles, being considered suitable for use as disinfectants.

Key words: disinfectant, *Thymus vulgaris*, *Elettaria cardamomum*, *Eugenia caryophyllus*.

^IPrograma de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil.

^{II}Departamento de Ciência dos Alimentos, UFLA, CP 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail: rhpiccoli@dca.ufla.br. *Autor para correspondência.

^{III}Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus Venda Nova do Imigrante, Venda Nova do Imigrante, ES, Brasil.

INTRODUÇÃO

Tanto a indústria de alimentos quanto a área da saúde necessitam de agentes antimicrobianos para garantir a inocuidade alimentar e a saúde do ser humano, respectivamente. Assim, cada vez mais agentes antimicrobianos são utilizados. Simultaneamente a esse fato, a investigação de novos agentes antimicrobianos tem ganhado destaque, devido ao aumento do número de bactérias que se mostram resistentes aos agentes desinfetantes utilizados, tanto na área médica quanto na indústria de alimentos (DAVIDSON & HARRISON, 2002). Embora existam vários antimicrobianos, com diferentes modos de ação, as bactérias podem desenvolver resistência a eles, devido, principalmente, à exposição das células a concentrações subletais de desinfetantes nas etapas de higienização na indústria ou nas desinfecções em ambientes hospitalares.

Exemplo mais recente é o aparecimento de bactérias multirresistentes produtoras de carbapenemase, que estão causando mortes devido a infecções nosocomiais ou sistêmicas no mundo todo. Devido a sua resistência a várias drogas não β -lactâmicas, poucas opções terapêuticas podem ser usadas com efetividade, assim, o controle de sua disseminação é crucial, sendo utilizados, para isso, agentes desinfetantes (NORDMANN et al., 2009).

Os extratos de plantas superiores foram e ainda são muito utilizados visando à obtenção de compostos com ação antimicrobiana, contudo, os óleos essenciais têm sido preferidos, uma vez que diminuem parâmetros de isolamento e purificação de compostos, além disso, eles apresentam elevada atividade antimicrobiana e, em concentrações adequadas, são considerados seguros (*Generally Recognized as Safe*).

Vários estudos mostram a eficácia dos óleos essenciais na inibição do crescimento microbiano (BURT, 2004; TAJKARIMI et al., 2010). Vários de seus compostos possuem atividade antimicrobiana, interferindo na permeabilidade da membrana citoplasmática, causando perdas de constituintes celulares, prejudicando sistemas enzimáticos, inativando ou destruindo o material genético de bactérias (SIKKEMA et al., 1995; BURT, 2004; TAJKARIMI et al., 2010) e causando lise da parede celular (OLIVEIRA et al., 2011).

Na busca de alternativas para o controle de microrganismos, o sinergismo entre diferentes fatores torna-se interessante (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Sabe-se que os microrganismos, quando expostos a temperaturas subletais, podem sofrer alterações fisiológicas que os tornam mais suscetíveis

a outras condições de estresse, quando expostos simultaneamente a essas condições, culminando na morte celular.

Dentre os microrganismos de interesse na área alimentícia e médica, destacam-se *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis, pois estão entre os mais importantes agentes patogênicos causadores de enfermidades em seres humanos, causando gastroenterites e trazendo riscos à saúde pública, além de estarem envolvidos em vários surtos de toxinfecções alimentares em todo mundo (LEUSCHNER & ZAMPARINI, 2002, GOVARIS et al., 2010; MEIRA et al., 2012).

Assim, neste trabalho, buscou-se determinar a atividade antimicrobiana e a curva de morte termoquímica das bactérias, empregando-se soluções desinfetantes dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia caryophyllus* (cravo da índia), *Foeniculum vulgare* dulce (funcho doce) sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos utilizados, padronização, estocagem e preparo dos inóculos

Os microrganismos utilizados foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, adquiridos da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil e *Salmonella enterica* serovar Enteritidis S64, gentilmente cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

As culturas estoque foram mantidas em meio de congelamento (glicerol; 15mL; peptona bacteriológica; 0,5g; extrato de levedura; 0,3g; NaCl; 0,5g; água destilada; 100 mL; pH 7,2 \pm 7,4) a -18°C. As cepas foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) com incubação a 37°C 24h⁻¹. Os inóculos foram padronizados em 10⁸UFC mL⁻¹ após elaboração de curvas de crescimento (D.O._{600nm}) em TSB (caldo tripton de soja) e plaqueamento periódico em TSA (ágar tripton de soja) e incubação a 37°C 24h⁻¹.

Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados foram *Thymus vulgaris* (tomilho), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia caryophyllus* (cravo da índia, botão) e *Foeniculum vulgare* dulce (funcho doce) adquiridos da FERQUIMA®.

Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Foi utilizada a técnica de diluição em ágar (NCCLS, 2003) com modificações. Os óleos essenciais foram homogeneizados em TSA, contendo 0,5% de Tween 80, obtendo-se as concentrações em (v/v) de: 0,00; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; e 5,0 % e distribuídas em placas de Petri. Alíquotas de 0,1mL das culturas padronizadas das bactérias foram transferidas para as placas e incubadas a 37°C 24h⁻¹. As menores concentrações dos óleos essenciais que resultaram em completa inibição do crescimento bacteriano no meio de cultura foram denominadas de CMI.

Curvas de morte termoquímica

A influência dos óleos essenciais e da temperatura sobre o tempo de inativação de *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* foi avaliada empregando-se o teste de diluição (ANDRADE & MACEDO, 1996). As soluções desinfetantes foram preparadas com a CMI dos óleos essenciais (foram selecionados aqueles com valores de CMI menores que 1%) homogeneizados em água peptonada 0,1% (m/v), contendo 10% de etanol. Alíquotas de 1mL das suspensões bacterianas padronizadas foram transferidas para tubos contendo 9mL das diferentes soluções. Após 10s, 10, 20 e 30min de exposição a 25 e 40°C, alíquotas de 1mL das suspensões foram transferidas para tubos contendo água peptonada 0,1% (m/v), sendo realizadas diluições seriadas. A enumeração das células viáveis foi realizada por plaqueamento em superfície em TSA e incubação a 37°C 24h⁻¹.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições em esquema fatorial. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade e, ou, análise de regressão.

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o *software* Sisvar versão 4.6.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Escherichia coli, *S. aureus* e *S. Enteritidis* apresentaram diferentes sensibilidades aos óleos essenciais testados. O óleo essencial com maior atividade antimicrobiana sobre todas as bactérias foi o de tomilho, com CMI de 0,25%. O de cravo da índia foi efetivo apenas sobre *E. coli* com MIC de 0,25%. Já os de funcho doce e cardamomo não apresentaram atividade antimicrobiana como o óleo

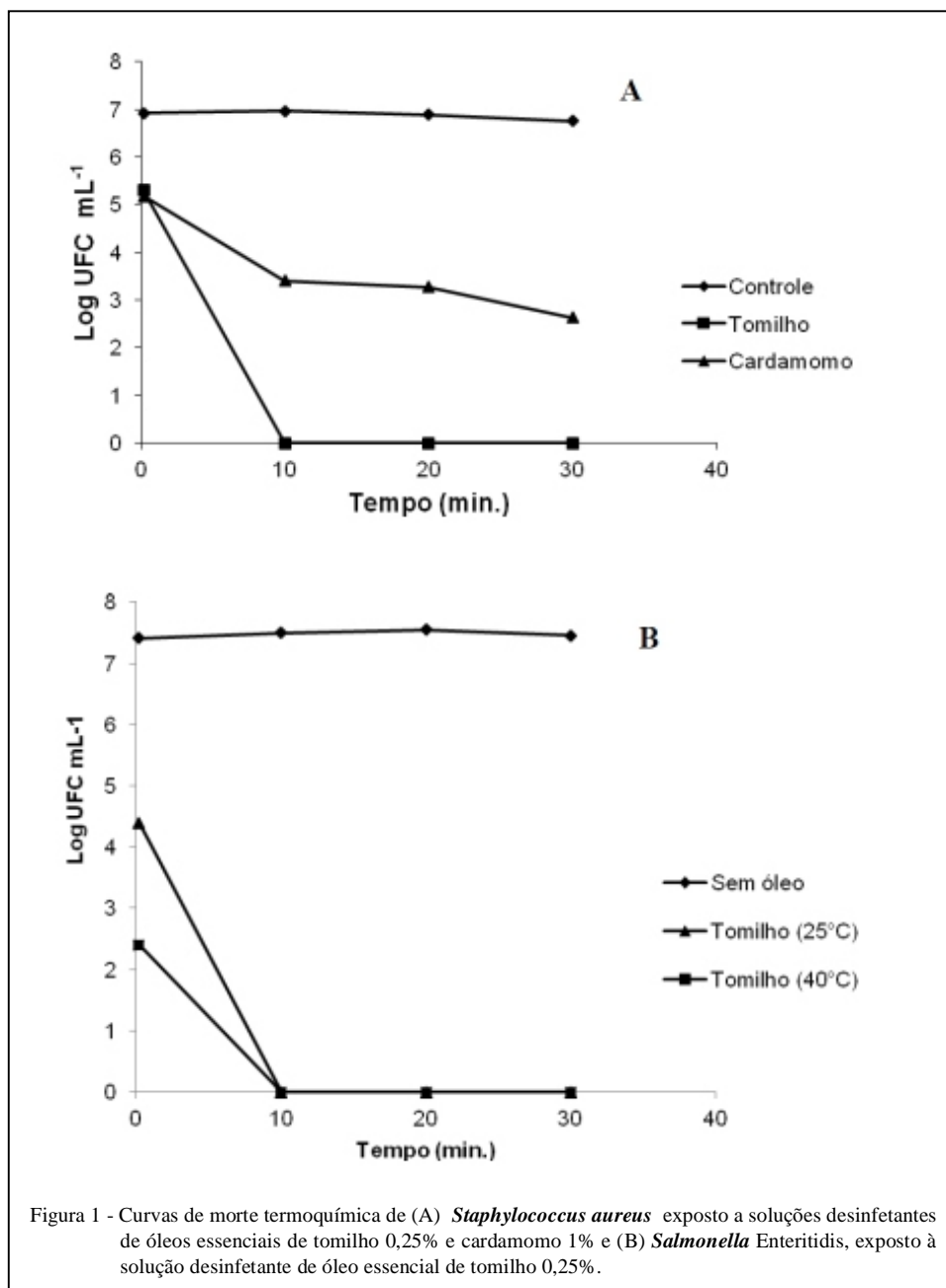
de tomilho, inibindo *S. aureus* nas CMI de 4% e 1%, respectivamente e *E. coli* na CMI de 1%. *S. Enteritidis* não foi sensível a esses óleos.

Visando a diminuir o forte odor dos óleos essenciais, característica indesejável em produto desinfetante, tanto na área médica quanto na indústria de alimentos, somente aqueles cuja CMI foi menor ou igual a 1% foram selecionados para o desenvolvimento deste trabalho. As curvas de morte termoquímica das bactérias expostas aos óleos essenciais são apresentadas nas figuras 1 e 2.

Avaliando-se a sensibilidade de *S. aureus* às soluções sanificantes dos óleos essenciais de cardamomo e tomilho, associada à temperatura e ao tempo de desinfecção, não foi observada influência significativa da temperatura, contudo, houve interação significativa entre os tratamentos com os óleos essenciais e o tempo de desinfecção (Figura 1A). Após 30 min. de desinfecção com óleo essencial de cardamomo, houve redução significativa (4,29Log UFC mL⁻¹) do número de células de *S. aureus*, já para a solução contendo óleo de tomilho, células viáveis não foram mais detectadas após 10min. (redução de 6,97Log UFC mL⁻¹). Pode-se observar na figura 1 que o rápido contato (10s) das células, tanto de *S. aureus* quanto *S. Enteritidis*, com as soluções sanificantes foi suficiente para promover redução do número de células viáveis quando comparado ao controle, cujo tempo de exposição não influenciou na morte das células.

Salmonella Enteritidis foi submetida ao processo de desinfecção utilizando-se apenas o óleo essencial de tomilho (Figura 1B). Houve interação significativa entre tratamento, tempo e temperatura de exposição das células. A temperatura da solução controle não influenciou na viabilidade celular de *S. Enteritidis* e o rápido contato do inóculo com a solução desinfetante (10s), tanto a 25°C quanto a 40°C, reduziu o número de células viáveis, respectivamente, em 2,62 e 5,14Log UFC mL⁻¹. Após 10min. não foram detectadas células viáveis de *S. Enteritidis* (redução de 7,4 Log UFC mL⁻¹).

Escherichia coli se mostrou a bactéria mais sensível aos óleos essenciais testados. Houve interação significativa entre os tratamentos, temperatura e tempo de desinfecção, não sendo observada influência da temperatura na viabilidade celular das células da solução controle. A figura 2 mostra as curvas de morte termoquímica de *E. coli* exposta às soluções desinfetantes de óleos essenciais de cardamomo, 1%, cravo da índia, 0,25%, funcho doce 1% e tomilho, 0,25%. *E. coli* foi mais sensível às soluções sanificantes contendo óleo essencial de funcho doce e cravo da índia (redução de 6,5Log

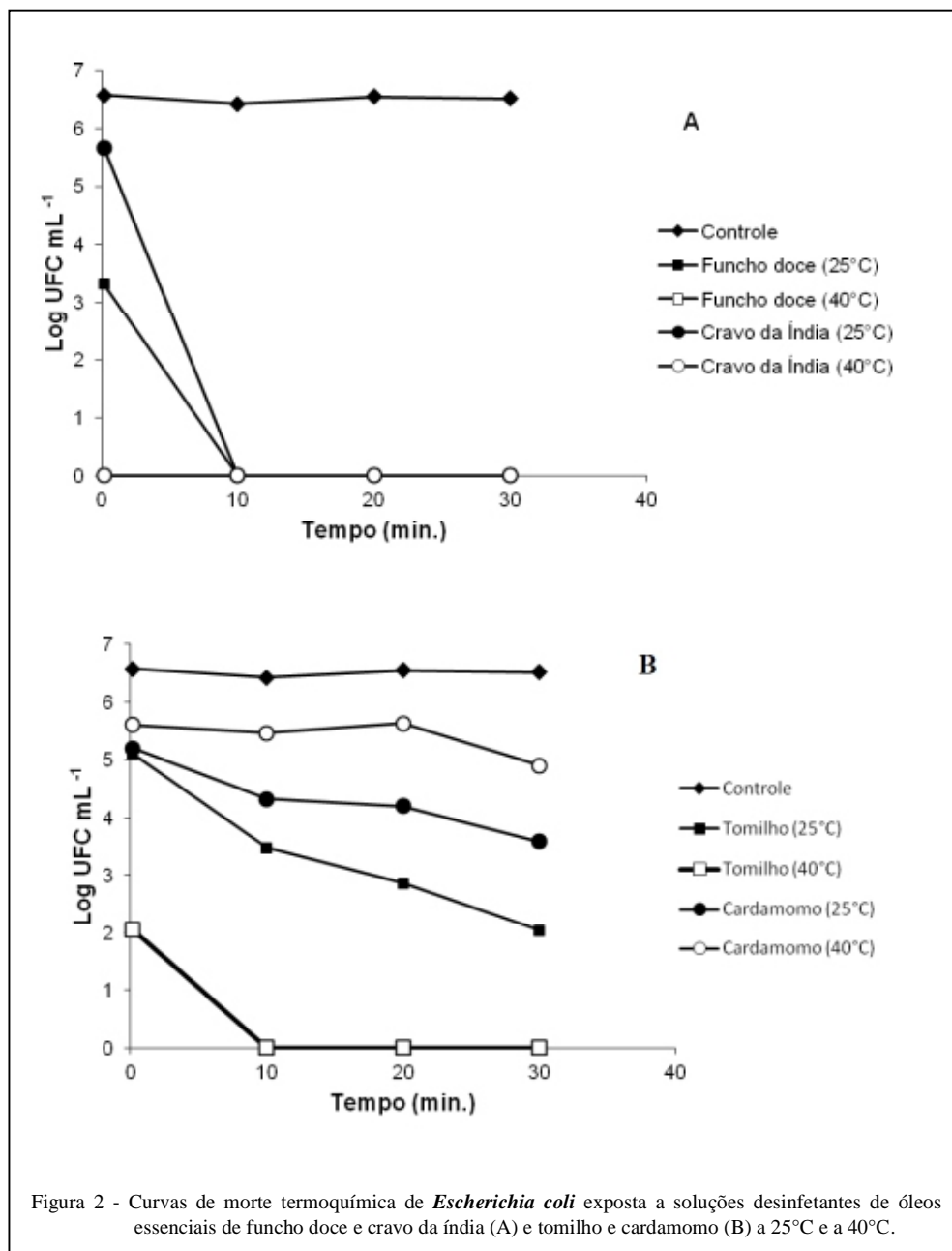


UFC mL⁻¹) a 40°C, após 10s de contato, do que a 25°C, cujo ciclo Log foi o mesmo, porém após 10min de contato (Figura 2A).

A solução sanificante contendo óleo essencial de tomilho não foi eficiente sobre *E. coli* em ambas as temperaturas, como o observado para *S. aureus* e *S. Enteritidis*. A 25°C, houve redução de 4,51Log UFC mL⁻¹ após 30min. de desinfecção. Já a 40°C, não foram detectadas células viáveis após

10min de contato (redução de 6,5Log UFC mL⁻¹). A solução contendo óleo de cardamomo foi aquela com menor atuação sobre *E. coli*. Embora a temperatura tenha influenciado significativamente na morte celular, 30min de tratamento não foram suficientes para eliminar as células bacterianas.

Na literatura, sugere-se que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada principalmente ao seu composto majoritário, embora



alguns autores mencionem a sinergia com os compostos minoritários (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008). A solução desinfetante contendo 0,25% de óleo essencial de cravo da Índia matou as células de *E.coli*. Esse óleo contém os compostos majoritários eugenol 85,3%; β -cariofileno 11,8% e α -humuleno, 1,5%; segundo cromatograma disponibilizado no sítio da empresa FERQUIMA para o lote utilizado nessa pesquisa. Apesar de não ser o único componente que

desempenhe ação antibacteriana, o eugenol tem sua atividade antimicrobiana comprovada (LEUSCHNER & ZAMPARINI, 2002; QIU et al., 2010).

MOREIRA et al. (2005), estudando vários óleos essenciais contra *E. coli* O 157:H7, observaram maior efetividade do óleo de cravo da Índia, MIC de 0,25%, igual ao valor encontrado para o presente trabalho. Contudo, a ação bactericida do óleo essencial em BHI não foi satisfatória (3,5 ciclos Log) após 15min

de contato a 20°C, não sendo observada alteração desse resultado mesmo após 20h. No presente trabalho, com a temperatura de exposição de 25°C ou 40°C, a redução do ciclo Log foi de 6,5 após 10min de contato.

Diferenças na atividade antibacteriana existentes entre óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, como as observadas entre os óleos estudados, são atribuídas aos seus compostos químicos (TAJKARIMI et al., 2010). A eficácia do óleo depende do pH da solução, temperatura de tratamento e das concentrações e tipo de componentes ativos (BURT, 2004).

Os compostos majoritários do óleo essencial de tomilho utilizado foram o timol, 47,3%, e o p-cineno, 26,8%, segundo cromatograma disponibilizado no sítio da FERQUIMA, para o lote de óleo adquirido. O timol é um composto fenólico, com ação antimicrobiana efetiva. A eficiência da solução sanificante a base de óleo essencial de tomilho a 0,25% sobre *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* pode ser atribuída à ação desses compostos, que ocorre sobre a membrana celular, onde o timol desorganiza a estrutura celular, promovendo desnaturação de enzimas essenciais (BURT, 2004). Além do timol, o óleo também continha carvacrol (3,1%) que juntamente com o p-cimeno (26,8%) possuem atividade antibacteriana e antifúngica.

A alta atividade bactericida da solução sanificante do óleo essencial de Funcho doce sobre *E. coli* e baixa atividade sobre *S. aureus* difere de estudos que relatam que bactérias Gram positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do que as Gram negativas, devido ao lipopolissacarídeo presente na membrana externa (OUSSALAH et al., 2007). Porém, BURT (2004) afirma que bactérias Gram positivas têm sido menos ou igualmente sensíveis a bactérias Gram negativas.

O óleo essencial de cardamomo possui como principais componentes o alfa-terpineol (3%), acetato de terpenila (36%), linalol (5%) e cineol na concentração de 34%, e sua solução sanificante a 1%, apesar de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* não mostrou atividade bactericida nos tempos e temperaturas estudados, embora MALTI et al. (2007) tenham observado atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas e negativas e encontraram resultados satisfatórios ao avaliar o óleo essencial dessa especiaria.

A solução sanificante a base de óleo essencial de tomilho foi a que mostrou os melhores resultados, apresentando atividade bactericida sobre *E. coli*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*, proporcionando ciclos Log maiores que 5, valor sugerido para que o sanificante seja considerado eficiente (ANDRADE

& MACEDO, 1996). As soluções a base de óleo de funcho doce e cravo apresentaram melhores resultados sobre *E. coli* e *S. aureus*, enquanto que a solução sanificante de cardamomo não mostrou atividade bactericida satisfatória sobre nenhum dos microrganismos estudados.

CONCLUSÃO

A solução desinfetante de tomilho 0,25% foi a mais eficiente dentre todas as soluções testadas. A solução desinfetante de cardamomo 1% não reduziu o número mínimo de células viáveis das bactérias testadas, não sendo considerada efetiva.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro (CBB - APQ-01758-11) e bolsa de iniciação científica concedidos e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de doutorado e iniciação científica concedidas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N.J.; MACEDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 165p.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>>. Acesso em: 15 dez. 2013. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>>. Acesso em: 14 dez. 2013. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996. 182p.
- DAVIDSON, P.M.; HARRISON, M.A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. **Food Technology-Champaign then Chicago**, v.56, n.11, p.69-78, 2002.
- GOVARIS, A. et al. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. **International of Food Microbiology**, v.137, p.175-180, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.017>>. Acesso em: 20 dez. 2013. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.017.
- LEUSCHNER, R.G.K.; ZAMPARINE, J. Effect of spices on growth and survival of *Escherichia coli* O 157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, v.13, p.399-404, 2002.
- MALTI, J.E. et al. Antimicrobial activity of *Elletaria cardamomum*: Toxicity, biochemical and histological studies.

- Food Chemistry**, v.104, p.1560-1568, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.043>>. Acesso em: 21 dez. 2013. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.02.043.
- MEIRA, Q.G.S. et al. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from food-contact surface and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v.25, p.469-475, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.030>>. Acesso em: 21 dez. 2013. doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.030.
- MOREIRA, M.R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, p.538-570, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>>. Acesso em: 20 dez. 2013. doi:10.1016/j.lwt.2004.07.012.
- NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne, Pa: USA, 2003. (Approved standard M7-A6).
- NORDMANN, P. et al. The real threat of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet infectious diseases**, v.9, n.4, p.228-236, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61345-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61345-8)>. Acesso em: 20 dez. 2013. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61345-8.
- OLIVEIRA, T.L.C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, n.3, p.546-555, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022>>. Acesso em: 21 dez. 2013. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.022.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effect of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-420, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>>. Acesso em: 10 dez. 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.11.009.
- QIU, J. et al. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.17, p.5846-5851, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00704-10>>. Acesso em: 20 dez. 2013. doi: 10.1128/AEM.00704-10.
- SIKKEMA, J. et al. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.59, n.2, p.201-222, 1995.
- TAJKARIMI, M.M. et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v.21, n.9, p.1199-1218, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>>. Acesso em: 22 dez. 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003.