

## Efeito do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. na resistência aos aminoglicosídeos em *Staphylococcus aureus*

### Effect of essential oil of *Ocimum basilicum* L. in the resistance to aminoglycosides in *Staphylococcus aureus*

Aparecida Sofia Fonseca Nunes<sup>1</sup>, Idglan Sá de Lima<sup>1</sup>, Luizângela Reis Osório<sup>2</sup>, Aislan Pereira Lira de Abreu<sup>3</sup>, Bernadete Helena Cavalcanti dos Santos<sup>4</sup>, Edeltrudes de Oliveira Lima<sup>5</sup>, Edson Cavalcanti da Silva Filho<sup>6</sup>, Josie Haydée Lima Ferreira<sup>1</sup>, Humberto Medeiros Barreto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Microbiologia. Departamento de Parasitologia e Microbiologia/CCS/UFPI

<sup>2</sup>Doutoranda em Biotecnologia, Campus Amílcar Ferreira Sobral/UFPI.

<sup>3</sup>Mestre em Farmacologia. Professor Assistente, FAESF

<sup>4</sup>Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Laboratório de Microbiologia Clínica/CCS/UFPB

<sup>5</sup>Laboratório de Micologia Clínica/CCS/UFPB. Professor Associado do Departamento de Ciências Farmacêuticas.

<sup>6</sup>Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados/CCN/UFPI.

\* Correspondência:

E-mail: hmbarreto@ufpi.edu.br

#### RESUMO

*Ocimum basilicum* L., vulgarmente conhecida como manjeriço é uma espécie pertencente à família Lamiaceae apresentando importantes atividades biológicas. A espécie *Staphylococcus aureus* é uma importante causa de infecções adquiridas em hospitais e na comunidade em todo o mundo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade moduladora da resistência aos aminoglicosídeos do óleo essencial de *O. basilicum* contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina de origem clínica. Ensaios de microdiluição foram realizados com os antibióticos neomicina e amicacina na presença e na ausência do óleo essencial de *O. basilicum* em concentrações subinibitórias. O óleo essencial de *O. basilicum* não apresentou atividade antibacteriana direta nas concentrações clinicamente relevantes testadas ( $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ ) contra as linhagens SA10 e ATCC25923. Por outro lado, quando o óleo essencial de *O. basilicum* foi adicionado ao meio de cultura em uma concentração subinibitória, verificou-se uma redução da CIM da neomicina (de 625 para  $156 \mu\text{g/mL}$ ) e da amicacina (de 311 para  $124 \mu\text{g/mL}$ ) contra a cepa SA10. Um efeito semelhante ocorreu quando o óleo essencial de *O. basilicum* foi substituído por clorpromazina, uma droga capaz de inibir bombas de efluxo bacteriana, sugerindo a ocorrência de um mecanismo de resistência mediado por bomba de efluxo na linhagem SA10. Estes resultados mostram que metabólitos secundários presentes no óleo essencial de *O. basilicum* podem atuar como moduladores da resistência aos aminoglicosídeos, indicando um possível uso destes metabólitos associados com neomicina ou amicacina no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Ocimum basilicum* L.; *Staphylococcus aureus*; atividade antimicrobiana; plantas medicinais; resistência bacteriana.

#### ABSTRACT

*Ocimum basilicum* L., commonly known as basil is a species belonging to the family Lamiaceae presenting important biological activities. *Staphylococcus aureus* is a common cause of hospital and community-acquired infections worldwide. The present study aimed to evaluate modulatory activity of the resistance to aminoglycosides of essential oil from *O. basilicum* in clinical isolate of methicillin resistant *S. aureus*. Microdilution assays were performed with neomycin and amikacin in the presence the absence of essential oil from *O. basilicum* in sub-inhibitory concentrations. The essential oil from *O. basilicum* presented no direct antibacterial activity in clinically relevant concentrations tested ( $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ ) against strains SA10 and ATCC25923. On the other hand, when the essential oil from *O. basilicum* was added to the culture medium at sub-inhibitory concentration, MIC reductions were verified for neomycin (from 625 to  $156 \mu\text{g/mL}$ ) and amikacin (311 to  $124 \mu\text{g/mL}$ ) against SA10 strain. A similar effect occurred as essential oil from *O. basilicum* was replaced for chlorpromazine, a drug able to inhibit bacterial efflux pumps, suggesting the occurrence of a mechanism of bacterial resistance mediated efflux in SA10 strain. These results show that metabolites secondary of essential oil from *O. basilicum* can act as modulators of resistance to aminoglycosides, indicating a possible use of these metabolites associated with neomycin or amikacin for the treatment of methicillin resistant *S. aureus* infections.

**KEYWORDS:** *Ocimum basilicum* L.; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial activity; medicinal plants; bacterial resistance.

## INTRODUÇÃO

As bactérias patogênicas são um problema de saúde pública que tem se agravado devido ao surgimento de microrganismos multirresistentes, provocando um aumento na prevalência de doenças infecciosas em todo o mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA, *methicillinresistant S. aureus*) estão frequentemente associadas a infecções adquiridas na comunidade e no ambiente hospitalar (WHO, 2014).

Em virtude desta ameaça crescente à saúde pública, muitos grupos de pesquisa têm se empenhado na busca por novos fármacos com potencial ação antimicrobiana capazes de eliminar bactérias resistentes aos antibióticos (IDSA, 2010). Nesta perspectiva, as plantas medicinais nativas da flora brasileira têm se apresentado como uma fonte promissora de princípios ativos com atividade antimicrobiana (CHOWDHURY et al., 2014; PINTO et al., 2013; DIAZ et al., 2010).

Além da atividade antimicrobiana direta, produtos naturais podem apresentar atividade moduladora da resistência bacteriana aos antibióticos, aumentando a eficácia destes fármacos contra bactérias multirresistentes SAMOILOVA, et al., 2014; SCHINDLER; JACINTO; KAATZ, 2013). A capacidade de modular a atividade de antibióticos pode ser uma estratégia interessante no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Tal atividade tem sido evidenciada em extratos ou óleos essenciais obtidos de várias espécies botânicas (BARRETO et al., 2014; TINTINO et al., 2013; COUTINHO et al., 2010).

A espécie *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) vulgarmente conhecida como manjerição, alfavaca ou basilicão, apresenta um grande potencial tecnológico na produção de óleos essenciais os quais são utilizados na indústria farmacêutica, bem como nas indústrias de alimentos e de cosméticos (CARVALHO et al., 2006; LABRA et al., 2004;). Na medicina popular, esta planta é usada como antiespasmódico, carminativo, digestivo e tônico (BUNRATHEP et al., 2007). Infusões preparadas a partir de suas folhas têm sido utilizadas também no tratamento de cefaleia, hemorroida e tosse (BATTISTI et al., 2013). O óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (OEOB) apresenta atividade antifúngica contra as espécies *Fulvia fulva*, *Glomerella cingulata*,

*Alternaria alternate* e *Fusario solani* (ZHANG; LI; WU, 2009), atividade antibacteriana contra as espécies *Salmonella* spp. *Escherichia coli* O157, *Campylobacter jejuni* e *Clostridium perfringens* (WANNISSORN et al., 2005), bem como atividade antioxidante (HUSSAIN et al., 2008; BOZIN et al., 2006; POLITEO et al., 2006). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. basilicum* também já foi evidenciada contra os fungos *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodiatheo bromae* e *Rhizopus solani*, bem como contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida* *Escherichia coli* (HUSSAIN et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade antibacteriana intrínseca, bem como avaliar a atividade moduladora da resistência aos antibióticos aminoglicosídeos do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (OEOB) em linhagem de *Staphylococcus aureus* multirresistente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagens bacterianas, fármacos e reagentes

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana na presença e na ausência do óleo essencial de *O. basilicum* (OEOB) foram realizados com uma linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 (CLSI, 2004) e uma linhagem MRSA de origem clínica (SA10). A linhagem derivada de cepa padrão ATCC (American Typing Culture Collection) foi adquirida da Empresa Laborclin (Pinhais, Paraná, Brasil). A linhagem SA10 faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba e foi gentilmente cedida pela Dra. Bernadete Helena Cavalcanti dos Santos. Estas linhagens foram mantidas em ágar nutriente (AN, Himedia, Índia) inclinado a 4°C. Os antibióticos neomicina e amicacina, bem como a clorpromazina foram obtidos da Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, EUA). Os antibióticos e a clorpromazina foram dissolvidos em água destilada esterilizada. O OEOB foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, MERCK) e as soluções-estoque foram diluídas com água destilada esterilizada.

### Material botânico

O óleo essencial de *O. basilicum* (OEOB) foi adquirido da Empresa Viessence (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). As

seguintes propriedades físico-químicas foram descritas pelo fornecedor através de laudo técnico: densidade de 0,898 g/mL a 20°C e presença dos fitoquímicos linalol e 1,8-cineol.

#### **Avaliação da atividade antibacteriana intrínseca do OEOB**

Uma solução estoque do óleo essencial foi preparada por dissolução de 10.000 µg do óleo em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), portanto, iniciando com uma concentração inicial de 10.000 µg/mL (10 mg/mL). A solução resultante foi então diluída em água destilada esterilizada em uma quantidade suficiente para atingir uma concentração de 1024 µg/mL. Foram realizados experimentos controles com o DMSO para observação de interferência ou não deste solvente no crescimento dos microrganismos testados e os resultados mostraram que o mesmo não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas.

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do OEOB e da clorpromazina foram determinadas pelo ensaio de microdiluição em caldo BHI 10% (JAVADPOUR et al., 1996). Para preparação da suspensão bacteriana, um inóculo do crescimento bacteriano em agar inclinado foi semeado por estrias múltiplas em placas de petri contendo agar nutriente (AN), seguido de incubação à 37°C por 24 horas. Após este período, um inóculo do crescimento bacteriano foi transferido para um tubo falcon contendo 3,0 mL de Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Índia), o qual foi incubado a 37°C por 24 horas. A partir desta cultura em BHI, preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala Mac Farland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Esta suspensão foi diluída de modo que a concentração final do inóculo em cada poço atingisse cerca de  $10^5$ UFC/mL (NCCLS, 2012).

Alíquotas de 100 µL desta suspensão foram distribuídas nos poços de uma placa de microtitulação no sentido alfabético (de A a H). Em seguida, foi realizada a microdiluição de 100 µL do produto-teste a 1024 µg/mL, nos poços de A a G (concentrações 512 a 8 µg/mL), tomando-se o cuidado de homogeneizar a solução por 3 vezes antes da transferência para o poço seguinte. No último poço (H) não foi adicionado o produto-teste, servindo este como controle positivo de crescimento bacteriano. Uma fileira de poços distribuída apenas com caldo BHI (sem inóculo e sem o produto-teste)

foi usada como controle negativo de crescimento (controle da contaminação do meio e/ou das microplacas). Em seguida as placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Para determinação da CIM, adicionou-se em todos os poços 20 µL de uma solução aquosa de resazurina sódica a 0,01% (m/v). As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e após este período procedeu-se a leitura, levando-se em consideração que a mudança de coloração de azul para rosa indicava a ocorrência de crescimento bacteriano devido à redução da resazurina (MANN; MARKHAN, 1998). A CIM foi definida como a menor concentração da droga em que não foi observado crescimento bacteriano. Para avaliação da atividade antibacteriana do OEOB foram adotados os critérios estabelecidos por HOLETZ et al. (2002): boa atividade inibitória (CIMs  $\leq 100$  µg/mL), atividade inibitória moderada (CIMs variando de 100 a 500 µg/mL), atividade inibitória fraca (CIMs de 500-1000 µg/mL) e sem atividade inibitória (CIMs > 1000 µg/mL).

#### **Avaliação do efeito modulador do OEOB sobre a atividade antibacteriana dos aminoglicosídeos**

Para a avaliação da atividade moduladora da ação antibacteriana dos aminoglicosídeos, as CIMs dos antibióticos foram determinadas na presença e na ausência de concentrações sub-inibitórias (1/8 da CIM) do OEOB (128 µg/mL) e da clorpromazina (8µg/mL). Experimentos-controle mostraram que, nestas concentrações, o óleo e a clorpromazina não apresentaram atividade antibacteriana. As concentrações dos antibióticos variaram de 2500 a 2,4 µg/mL. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 24 h e após este período procedeu-se a leitura com a adição de resazurina sódica a 0,01% conforme descrito no item 2.3.

#### **Análises estatísticas**

Cada experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram normalizados pelo cálculo da média geométrica das CIMs. O erro padrão e o desvio padrão da média geométrica foram determinados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrism, versão 5.02. A ocorrência de diferenças entre o tratamento com antibióticos na ausência e na presença do OEOB e clorpromazina foi examinada através da análise de variância de duas etapas

(ANOVA). As diferenças mencionadas acima foram analisadas através do pós-teste de Bonferroni e foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os critérios adotados no presente estudo (HOLETZ et al., 2002), o OEOB não apresentou atividade antibacteriana direta nas concentrações clinicamente relevantes testadas contra as linhagens de *S. aureus* SA10 e ATCC25923 (Tabela 1). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por POZZO et al. (2011), os quais não evidenciaram atividade antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativos isolados de mastite caprina. Resultados semelhantes foram obtidos por TRAJANO et al. (2009). No entanto, HUSSAIN et al. (2008) verificaram que a atividade antibacteriana do OEOB é influenciada pela sazonalidade, com CIMs contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 variando de 900 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  de acordo com a estação do ano.

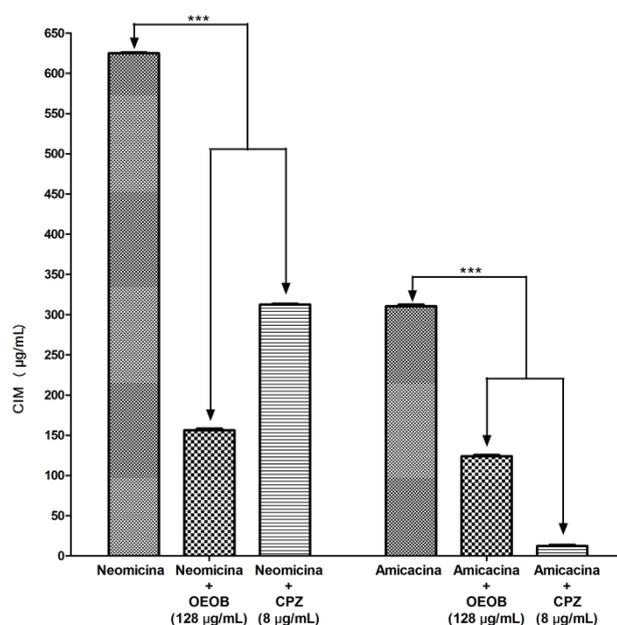
Tabela 1 – Avaliação da CIM (concentração inibitória mínima) do óleo essencial de *O. basilicum* contra cepas de *S. aureus*.

Cepas	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	OEOB	DMSO
ATCC 25923	$\geq 1024$	2048
SA10	$\geq 1024$	2048

Por outro lado, quando o OEOB foi adicionado ao meio de cultura em uma concentração subinibitória, verificou-se uma redução da CIM da Neomicina (de 625 para 156  $\mu\text{g/mL}$ ) e da Amicacina (de 316 para 124  $\mu\text{g/mL}$ ) contra a cepa SA10. Um efeito semelhante ocorreu quando o OEOB foi substituído por clorpromazina (Figura 1), uma droga que atua inibindo bombas de efluxo, sugerindo a ocorrência de um mecanismo de resistência mediado por bomba de efluxo.

**Figura 1– CIM dos antibióticos testados na ausência e na presença do óleo essencial de *O. basilicum* (OEOB) e clorpromazina (CPZ) para MRSA (SA10). Cada resultado**

**representa a média geométrica de três experimentos simultâneos. (\*\*\*) Valores estatisticamente significantes ( $p < 0,001$ ).**



Os óleos essenciais são misturas complexas, constituídos principalmente de compostos hidrofóbicos, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Vários destes compostos estão presentes na composição de óleos essenciais extraídos das folhas de *O. Basilicum*, incluindo eugenol, metil chavicol, linalool, 1,8-cineol, estragol limoneno,  $\alpha$ -felendreno, *p*-cimeno, fenchona, camphora, terpineol, geraniol, eugenol e farneseno (HASSANPOURAGHDAM et al., 2010; CHALCHAT; ÖZCAN, 2008; POLITEO; JUKIC; MIKOS, 2007; LABRA et al., 2004). Tais compostos podem interagir com resíduos hidrofóbicos de proteínas e com fosfolipídeos da membrana citoplasmática, aumentando a sua permeabilidade (LUZ et al., 2014; SOUZA et al., 2013), o que poderia estar promovendo uma maior assimilação dos aminoglicosídeos pela célula bacteriana.

Por outro lado, tais componentes poderiam também inibir o efluxo dos aminoglicosídeos testados, seja por dissipação da força próton motiva (SIKKEMA, et al., 1994) ou por ligação em sítios hidrofóbicos de bombas de efluxo (BOLLA et al., 2010). No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os compostos do OEOB responsáveis pelo aumento da atividade dos aminoglicosídeos, bem como o mecanismo de ação relacionado com a atividade moduladora da resistência aos antibióticos testados.

## CONCLUSÃO

Estes resultados indicam o potencial biotecnológico do OEOB como agente modulador da resistência aos aminoglicosídeos, pois sugerem que este produto natural contém fitoquímicos que poderiam ser utilizados em associação com os aminoglicosídeos neomicina e amicacina no tratamento de infecções causadas por MRSA. Estudos adicionais são recomendados para a indicação de associação do OEOB com tais antibióticos.

## REFERENCIAS

- BARRETO, H. M.; LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. R.; MOURÃO, R. A.; SANTOS, B. H. C.; COUTINHO, H. D. M.; ABREU, A. P. L.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Effect of *Lippia origanoides* H. B. K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**, v.6, p.560-564, 2014;
- BATTISTI, C.; GARLET, T.M.B.; ESSI, L.; HORBACH, R.K.; DE ANDRADE, A.; BADKE, M.R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.11, n.3, p.338-348, 2013;
- BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009;
- BOZIN, B.; DUKIC, N.M.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.54, p.1822-1828, 2006;
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004;
- BUNRATHEP, S.; PALANUVEJ, C.; RUANGRUNGSI, N. Chemical compositions and antioxidative activities of essential oils from four *Ocimum* species endemic to Thailand. **Journal of Health Research**, v.21, p.201-203, 2007;
- BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p.205-210, 2003;
- CARVALHO, F. J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A. S.; CAVALCANTI, S.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANNR. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.24-30, 2006;
- CHAUCHAT, J.C.; ÖZCAN, M.M. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. **Food Chemistry**, v.110, p.501-503, 2008;
- CHOWDHURY, A.; AZAM, S.; JAINUL, M.A.; FARUQ, K.O.; ISLAM, A. Antibacterial activities and *In vitro* anti-inflammatory (membrane stability) properties of methanolic extracts of *Gardenia coronaria* leaves. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1-5, 2014;
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved standard: M22-A3, Quality control for commercially prepared microbiological culture media, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa. 2004;
- COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; LIMA, E.O. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1002-1006, 2010;
- DIAZ, M.A.N.; ROSSI, C.C.; MENDONÇA, V.R.; SILVA, D.M.; RIBON, A.O.B.; AGUILAR, A.P.; MUÑOZ, G.D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 724-728, 2010;
- HASSANPOURAGHDAM, M.B.; GOHARI, G.R.; TABATABAEI, S.J.; DADPOUR, M.R. Inflorescence and leaves essential oil composition of hydroponically grown *Ocimum basilicum* L. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.75, n.10, p. 1361-1368, 2010;

HOLETZ, F.B. *et al.*, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002;

HUSSAIN A.I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S.T.H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends of seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008;

IDS, INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. The 10x20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 1081-1083, 2010;

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal Medicinal Chemistry**, v.39,n.16, p.3107-3113, 1996;

LABRA, M.; MIELEB, M.; LEDDAB, B.; GRASSIC, F.; MAZZEIB, M.; SALAC, F. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars. **Plant Science**, v.167, p.725-731, 2004.

LUZ, I.S.; MELO, A.N.F.; BEZERRA, T.K.A., MADRUGA, M.S.; MAGNANI, M.; SOUZA, E.L. Sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol cause injury and changes in membrane fatty acid of *Salmonella Typhimurium* cultivated in a meat broth. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.11, n.5, p.357-361, 2014;

MANN, C.M.; MARKHAN, J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, 6th ed, NCCLS document M7-A6. Wayne: NCCLS. 2003;

PINTO, C.P.; RODRIGUES, V.D.; PINTO, F.P.; PINTO, R.P.; UETANABARO, A.P.T.; PINHEIRO, C.S.R.; GADEA, S.F.M.; SILVA, T.R.S.; LUCCHESI A.M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-

infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.1-5, 2013;

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil accepted. **Food Chemistry**, v.101, p.379-385, 2006.

POZZO, M.D.; VIEGAS, J.; SANTURIO, D.F.; ROSSATTO, L.; SOARES, I.H.; ALVES, S.H.; COSTA, M.M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n.4, p.667-672, 2011.

SAMOILOVA, Z.; SMIRNOVA, G.; MUZYKA, N.; OKTYABRSKY. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics. **Microbial Research**, v. 169, p. 307-313, 2014;

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004;

SOUZA, E.L.; OLIVEIRA, C.E.V.; STAMFORD, T.L.M.; NETO, N.J.G. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, enterotoxin production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 29-35, 2013;

TINTINO, S.R.; CUNHA, F. A. B.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G.M.M.; SOUZA, C.E. S.; EDINARDO, F.F.M.; BRAGA, M.F.B.M.; ANDRADE, J. C.; COSTA, J.G.M., FREITAS, M.A.; COUTINHO, H.D.M. Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus* cf. *arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira Biociências**, v.11, n.2, p.157-162, 2013;

TRAJANO, V.N.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.542-545, 2009;

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI,

M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49,p.2474-2478, 2005;

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v.76, p.233-236, 2005;

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance**. 2014. 256p. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Acesso em: 02 Abr. 2014;

ZHANG, J.W.; LI, S.K.; WU, W.J. The main chemical composition and *in vitro* antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. **Molecules**, v.14, p.273-278, 2009.