

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial da Erva-Cidreira



ISSN 1679-6543

Novembro, 2012

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 60

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial da Erva-Cidreira

*Terezinha Feitosa Machado
Nádia Accioly Pinto Nogueira
Rita de Cássia Alves Pereira
Civita Teixeira de Sousa
Valéria Chaves Vasconcelos Batista*

Embrapa
Brasília, DF
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Unidade responsável pelo conteúdo e edição

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici
CEP 60511-110 Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109
Home page: www.cnpat.embrapa.br
E-mail: vendas@cnpat.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente: *Marlon Vagner Valentim Martins*
Secretário-Executivo: *Marcos Antonio Nakayama*
Membros: *José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues
Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa
Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda*

Revisão de texto: *Marcos Antonio Nakayama*
Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid*
Edição eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*
Fotos da capa: *Terezinha Feitosa Machado e Rita de Cássia Alves
Pereira*

1ª edição (2012): versão eletrônica

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria Tropical

Atividade Antimicrobiana do óleo essencial da erva-cidreira / Terezinha Feitosa Machado... [et al.]. – Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

15 p.; 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543, 60).

1. *Lippia alba*. 2. Ação antimicrobiana. 3. Patógenos. 4. Deteriorantes. I. Machado, Terezinha Feitosa. II. Nogueira, Nádia Accioly Pinto. III Pereira, Rita de Cassia Alves. IV. Sousa, Civita Teixeira de. V. Batista, Valéria Chaves Vasconcelos. VI. Série.

CDD 661.806

© Embrapa 2012

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	10
Conclusões.....	12
Referências	13

Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial da Erva-Cidreira

*Terezinha Feitosa Machado*¹

*Nádia Accioly Pinto Nogueira*²

*Rita de Cássia Alves Pereira*³

*Civita Teixeira de Sousa*⁴

*Valéria Chaves Vasconcelos Batista*⁵

Resumo

Neste trabalho, foi avaliado o potencial antimicrobiano do óleo essencial da erva-cidreira (*Lippia alba*). Para estabelecer esse potencial, foram utilizadas seis espécies bacterianas relacionadas à deterioração e doenças transmitidas por alimentos (DTA): *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Os métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo foram empregados para determinar a atividade antimicrobiana e concentração inibitória mínima (CIM) para cada espécie. Os resultados mostraram que o óleo essencial avaliado inibiu o crescimento de todas as espécies bacterianas, Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as primeiras as mais sensíveis ao óleo. O diâmetro do halo de inibição variou de 15,5 mm a 7,0 mm e a CIM

¹Engenheira de alimentos, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, terezinha.feitosa@embrapa.br

²Química Industrial, D.Sc. em Bioquímica, professora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, acciolyufc@gmail.com

³Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Fitotecnia/Plantas Medicinais, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, rita.pereira@embrapa.br

⁴Engenheira de alimentos, mestranda em Engenharia Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, civitatsou@ig.com.br

⁵Estudante de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, valeriacvb@ig.com.br

variou de 0,29 mg/mL a 9,37 mg/mL. Os resultados demonstram que o óleo essencial da erva-cidreira apresenta grande potencial como agente antimicrobiano natural.

Termos para indexação: *Lippia alba*, ação antibacteriana, patógenos e deteriorantes.

Antimicrobial Activity of Lemon Balm Essential Oil

Abstract

In this work, it was evaluated the antimicrobial potential of essential oil of lemongrass (Lippia alba). To establish this potential, six bacterial species related to spoilage and foodborne disease, Listeria monocytogenes, L. innocua, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella choleraesuis, were used. The methods of agar diffusion and broth microdilution were employed to determine the antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration (MIC) for each species. The results showed that the essential oil evaluated inhibited the growth of all bacterial species, Gram-positive and Gram-negative, the former being more sensitive to oil. The diameter of inhibition zone ranged from 15.5 mm to 7.0 mm and the MIC varied between 0.29 mg/mL to 9.37 mg/mL. The results showed that the evaluated essential oil present high potential as natural preservative.

Index terms: Lippia alba, antibacterial action, pathogens and spoilage.

Introdução

A necessidade de garantir a segurança alimentar e, ao mesmo tempo, atender às demandas para conservação de atributos nutricionais e de qualidade têm impulsionado a pesquisa para o desenvolvimento de métodos alternativos na conservação de alimentos. Essas demandas crescentes abrem novas perspectivas para o uso de conservantes naturais derivados de plantas, animais ou microrganismos (TIWARI et al., 2009).

Originalmente, as ervas e especiarias foram utilizadas para mudar ou melhorar o sabor dos alimentos. Entretanto, produtos do metabolismo secundário das plantas, como os óleos essenciais, desempenham naturalmente importante papel na proteção de plantas contra agentes infecciosos (BAKKALI et al., 2008). Muitos dos constituintes desses óleos são conhecidos por retardar ou inibir o crescimento de bactérias, fungos, vírus e insetos (BURT; REINDERS, 2003; CHORIANOPOULOS et al., 2008).

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*) é uma planta nativa da América do Sul, conhecida popularmente como erva-cidreira. Folhas e raízes da planta são utilizadas na medicina popular sob diversas formas no tratamento de doenças gástricas, antipiréticas, como analgésico e sedativo (HEINZMANN; BARROS, 2007). Dentre os metabólitos secundários descritos para essa espécie, destaca-se o óleo essencial, cujos constituintes são mono e sesquiterpenos (PASCUAL et al., 2001). Extratos etanólicos de suas folhas são citados com atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (SENA FILHO et al., 2006) e diferentes microrganismos (AGUIAR et al., 2008), enquanto o óleo essencial foi citado com atividade sobre *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (ALEA et al., 1997), *Candida albicans* (DUARTE et al., 2005), *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* (MESA-ARANGO et al. 2009).

Por serem desprovidas de ações tóxicas, as infusões de erva-cidreira podem ser consumidas em altas dosagens (MATOS, 1998), e o

seu óleo essencial é promissor para o controle de microrganismos indesejáveis em alimentos (TAVARES et al., 2005).

Com base nisso, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial *L. alba* sobre bactérias deteriorantes e patogênicas veiculadas por alimentos.

Material e Métodos

Material vegetal

Amostras de folhas de *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown (*Verbenaceae*) foram obtidas de plantas matrizes do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical, localizado no Município de Paraipaba, CE. Parte da matéria-prima foi submetida à desidratação em secador de bandejas com circulação de ar, a temperaturas de 30 °C, por 24 horas (BARBOSA; BARBOSA, 2006).

Extração do óleo essencial

O material vegetal, constituído de folhas frescas e secas, foi submetido à hidrodestilação por 4 horas, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. O óleo essencial separado por centrifugação foi submetido à secagem com Na₂SO₄, e o seu volume foi determinado em tubo de centrífuga graduado. O óleo obtido foi transferido para frascos de vidro âmbar com tampa rosqueada e armazenado sob refrigeração até o momento das análises (CRAVEIRO et al., 1976).

Microrganismos

As espécies bacterianas usadas neste estudo foram *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria innocua* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC 33090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Todas as espécies foram mantidas a -80 °C em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) contendo 20% de glicerol. As culturas de trabalho foram preparadas pelo subcultivo de 100 µL de cada cultura estoque em 9 mL de caldo BHI (Merck) e incubadas a 35 °C até atingirem fase exponencial de crescimento (12 horas). Após esse

período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à do tubo 0,5 da escala de McFarland (Biomérieux Inc.), o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL.

Determinação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de difusão em ágar descrito pelo NCCLS (NATIONAL..., 2003a), com modificações. Suspensões microbianas foram semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton (Difco). Com um perfurador estéril, foram feitos poços de 5 mm de diâmetro interno, aos quais foram adicionados 25 μ L do óleo essencial de *L. alba* de folhas frescas e secas, em concentrações binárias variando de 375 mg/mL a 2,93 mg/mL e 427,4 mg/mL a 3,3 mg/mL respectivamente, preparadas em Tween 80 1%. As placas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente durante 30 minutos, para permitir a difusão do óleo e, posteriormente, incubadas a 35 °C/18 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela medida do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano em torno dos poços. Halos com diâmetros iguais ou superiores a 7 mm foram considerados indicativos de sensibilidade bacteriana ao óleo. Soluções estéreis de Tween 80 (VETEC) 1% e 1,2 mg/mL de amicacina (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) foram usadas como controles negativo e positivo do experimento, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do óleo essencial de *L. alba* para as cepas bacterianas foi determinada pelo método da microdiluição em caldo de cultura (NATIONAL..., 2003b), com modificações. Suspensões bacterianas com densidade celular ajustada para 10⁸ UFC/mL, como descrito anteriormente, foram diluídas em caldo BHI estéril, para aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Aos poços-teste, de placas de microdiluição com 96 poços, foram adicionados 80 μ L das suspensões microbianas, 100 μ L de caldo BHI (Merck) e 20 μ L de diluições binárias do óleo de folhas frescas e secas. Nos poços-controle, foram adicionados 80 μ L das suspensões microbianas, 100 μ L de caldo BHI

e 20 μL de solução estéril de amicacina 1,2 mg/mL ou de Tween 80 1%. A inspeção visual do crescimento microbiano foi realizada após incubação a 35 °C durante 24 horas. A menor concentração do óleo na qual não foi evidenciado crescimento microbiano foi determinada como CIM.

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Baron et al. (1994). Com auxílio de pipetas bacteriológicas, foram retiradas alíquotas de 50 μL dos poços que não apresentaram turvação visível nas microplacas usadas na determinação da CIM; essas alíquotas foram semeadas na superfície de ágar *Plate-Count* (Merck). Após 24 horas a 35 °C, foi realizada a contagem das colônias crescidas sobre a superfície do meio. A concentração do óleo capaz de determinar um crescimento microbiano inferior a 0,1% do inóculo inicial foi considerada como a CBM. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de Tukey a 5% de significância (SAS, 2001)

Resultados e Discussão

Atividade antimicrobiana

Os óleos essenciais provenientes de folhas frescas e secas de *L. alba* apresentaram atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas com um largo espectro de ação, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo mais eficiente contra as primeiras (Tabela 1). *S. aureus* foi a espécie mais sensível à ação do óleo, tendo o crescimento inibido nas concentrações de 23,4 mg/mL e 26,7 mg/mL dos óleos essenciais provenientes de folhas frescas e secas, respectivamente. O óleo essencial de folhas frescas mostrou-se mais eficiente do que o proveniente de folhas secas contra espécies bacterianas testadas, exceto para *L. innocua*.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Lippia alba*.

Microorganismo	Folhas frescas		Folhas secas		Controle (Amicacina)	
	Diâmetro HI (mm)*	mg/mL	Diâmetro HI (mm) ⁽¹⁾	mg/mL	Diâmetro HI (mm) ⁽¹⁾	mg/mL
<i>S. aureus</i>	15,5 ± 0,7	23,4	14,0 ± 1,4	26,7	35,0 ± 0,0	1,2
<i>L. monocytogenes</i>	9,0 ± 1,4	46,9	8,0 ± 0,0	53,4	35,0 ± 0,0	1,2
<i>L. innocua</i>	10,5 ± 0,7	46,9	13,0 ± 1,4	53,4	35,0 ± 0,0	1,2
<i>E. coli</i>	10,5 ± 0,7	188	9,0 ± 1,4	214,7	30,0 ± 0,0	1,2
<i>P. aeruginosa</i>	8,0 ± 0,0	188	7,0 ± 0,0	427,5	30,0 ± 0,0	1,2
<i>S. choleraesuis</i>	9,0 ± 0,0	375	9,0 ± 1,4	427,5	30,0 ± 0,0	1,2

⁽¹⁾Média ± desvio padrão (σ) dos halos de inibição de crescimento (mm) de dois ensaios; diâmetro do poço: 5 mm; volume do óleo essencial aplicado em cada poço: 25 μ L; controle negativo: tween 80 1%.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas frescas e secas de *L. alba* foi confirmada pelos valores da CIM e CBM ($\leq 1,33$ mg/mL) observados contra quatro das seis espécies bacterianas testadas, sendo mais eficiente contra *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *E. coli*, importantes espécies patogênicas e indicadoras de qualidade em alimentos (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações inibitória (CIM) e Bactericida (CBM) mínimas dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *L. alba*.

Microorganismo	Folhas frescas		Folhas secas	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	0,29	0,29	0,33	0,33
<i>L. monocytogenes</i>	0,58	0,58	1,33	1,33
<i>L. innocua</i>	0,58	1,17	1,33	1,33
<i>E. coli</i>	1,17	1,17	1,33	1,33
<i>S. choleraesuis</i>	9,37	9,37	5,34	5,34
<i>P. aeruginosa</i>	9,37	9,37	5,34	5,34

Controles de experimento: Amicacina 1,2 mg/mL; Tween 80 1% – sem atividade.

Alguns estudos têm mostrado aplicações bem sucedidas dos óleos essenciais e seus compostos, isolados ou em combinações com outros métodos de conservação, na redução e no controle de microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos (MAHMOUD et al., 2006; MARTÍNEZ-ROMERO et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2008). Neste estudo, os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar mostraram que o óleo essencial de *L. alba* tem atividade antimicrobiana contra todas as espécies bacterianas testadas com diferentes intensidades. Os baixos valores das CIM e CBM ($\leq 0,58$) confirmam a forte atividade especialmente contra as espécies Gram-positivas. Tavares et al. (2005) associaram essa atividade à presença de E-citral, neral, d-limoneno, germacreno D no óleo, que têm considerável atividade antimicrobiana tanto contra bactérias Gram-positivas como contra bactérias Gram-negativas.

Segundo Heinzmann e Barros (2007), uma das espécies de plantas nativas promitentes ao desenvolvimento de um novo fármaco é, sem dúvida, *Lippia alba*. Com essa espécie têm sido realizados vários estudos pré-clínicos, evidenciando várias das atividades relacionadas ao seu uso popular. Paralelamente, uma série de trabalhos realizados comprovou a eficácia do óleo essencial e extratos dessa espécie, no controle do crescimento de microrganismos comumente envolvidos na deterioração e em doenças veiculadas por alimentos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho e nos demais citados da literatura, é possível evidenciar que a espécie *L. alba* também é promissora ao desenvolvimento de novo conservante.

Conclusões

A ação do óleo essencial de *L. alba* sobre diferentes microrganismos deteriorantes e patogênicos mostra seu grande potencial como agente antimicrobiano natural para conservação de alimentos. Contudo, a exemplo de outras espécies nativas, *L. alba* necessita de um maior número de estudos para poder gerar um conservante cientificamente validado para garantir eficácia, segurança e qualidade dos alimentos.

Referências

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 3, p. 436-440, 2008.

ALEA, J. A; LUIS, A.G.; PERÉZ, A.R.; JORGE, M.R.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. **Revista Cubana de Farmacología**, v. 30, p. 29-35, 1997.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C. A. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p.1221-1225, 2006.

BARON, E. J; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Bailey and Scott's diagnostic microbiology**. 9. ed. St. Louis: Mosby, 1994, p. 401-402.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letter Applied of Microbiology**, v. 36, p.162-167, 2003.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N. HAROUTOUNIAN, S. A. NYCHAS, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acidbase sanitizers. **Journal Applied of Microbiology**, v.104, p.1586-1869, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W. A. simple and inexpensive steam

generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, v. 53, n.10, p.652, 1976.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

GUTIERREZ, J.; RODRIGUEZ, G.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. **Journal Food Protection**, v. 71, n. 9, p.1846-1854, 2008.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Saúde**, v. 33, n. 1, p. 43-48, 2007.

MAHMOUD, B. S.; YAMAZAKI, K.; MIYASHITA, K.; KAWAI, Y.; SHIN, I. S.; SUZUKI, T. Preservative effect of combined treatment with electrolyzed NaCl solutions and essential oil compounds on carp fillets during convectional air-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, n. 3, p. 33-337, 2006.

MARTÍNEZ-ROMERO, D.; GUILLÉN, F.; VALVERDE, J. M.; BAILÉN, G.; ZAPATA, P.; SERRANO, M.; CASTILLO, S.; VALERO, D. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.144-148, 2007.

MATOS, F. J. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed. Fortaleza: Editora da UFC, 1998. 220 p.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n. 6, p. 878-84, 2009.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6. ed. Wayne, 2003b. (Document M7-A6)

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standards**. 8. ed. Wayne, 2003a. (Document M2-A8).

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-14, 2001.

SAS. **Statistical analysis system user's guide**, v. 5.1. Cary, 2001.

SENA FILHO, J. G.; MELO, J. G. S.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, A. M.; PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n. 4, p.506-509, 2006.

TAVARES, E. S, JULIÃO, L. S., LOPES, D., BIZZO, H. R., LAGE, C. L. S., LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.1-5, 2005.

TIWARI, B. K.; VALDRAMIDIS, V. P.; O' DONNELL, C. P. MUTHUKUMARAPPAN K, BOURKE P, CULLEN PJ: Application of natural antimicrobials for food preservation: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5987-6000, 2009.



Agroindústria Tropical

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

