

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA-PR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

LUAN CARLOS MACHADO

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* CONTRA CEPAS PADRÕES DE
Staphylococcus aureus E *Escherichia coli***

REALEZA-PR

2024

LUAN CARLOS MACHADO

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* CONTRA CEPAS PADRÕES DE
Staphylococcus aureus E *Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

REALEZA-PR

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Machado, Luan Carlos
ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus
officinalis* CONTRA CEPAS PADRÕES DE *Staphylococcus
aureus* E *Escherichia coli* / Luan Carlos Machado. --
2024.
15 f.

: Doutor Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina Veterinária, Realeza, PR, 2024.

1. Alecrim. 2. *S. aureus*. 3. *E. coli*. I. Freitas,
Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LUAN CARLOS MACHADO

**ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* CONTRA CEPAS PADRÕES DE
Staphylococcus aureus E *Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária da
Universidade Federal da Fronteira Sul
(UFFS), como requisito para obtenção do
título de Médico Veterinário.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 29/11/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fagner Luiz da Costa Freitas – UFFS

Orientador

Documento assinado digitalmente
 **EVERTON ARTUSO**
Data: 05/12/2024 17:53:22-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Everton Artuso -

UFFS Avaliador

Documento assinado digitalmente
 **CAMILA CARDOSO ROLO**
Data: 05/12/2024 21:29:31-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Camila Cardoso Rolo - Mestranda UFFS

Avaliadora

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa o resultado de uma jornada de aprendizado e dedicação, que não seria possível sem o apoio de várias pessoas que fizeram parte desse processo. Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Prof. Fagner Luiz Da Costa Freitas por sua orientação, paciência e incentivo ao longo deste projeto, foram inúmeros dias de colheita e processamento de plantas medicinais e extração de óleos essenciais, dias e noites no laboratório de microbiologia, momentos especiais dos quais lembrarei com muito carinho, sua experiência e disponibilidade foram fundamentais para que este trabalho alcançasse seu objetivo.

Aos meus amigos Tayná Eloise Lopes De Oliveira , Guilherme Kanieski Takes e Paulo Henrique Figueiredo meus mais profundos agradecimentos pelo apoio, pelas conversas, desabafos, troca de experiências e aprendizado mútuo, vocês têm um papel muito importante na minha formação como ser humano.

Aos meus pais, Carlos Machado e Néli Sierota Machado que estiveram ao meu lado em todos os momentos, oferecendo amor, compreensão e suporte incondicional. Sua confiança em mim foi uma fonte inesgotável de força e motivação, muito obrigado também a minha avó Santa Minuzzo Machado e ao meu avô Ramão Machado pelos conselhos sábios e pelo amor incondicional.

Por fim, agradeço aos Técnicos do Laboratório: Edinéia de Paula Sartori Schmitz e Adriano Favero pelo apoio em todo o processo, e muito obrigado aos convidados da banca, Professor Everton Artuso e à Médica Veterinária Camila Cardoso Rolo pela disponibilidade.

Análise da composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Analysis of the chemical composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Luan Carlos Machado¹, Fagner Luiz da Costa Freitas^{1*}

RESUMO

A pesquisa avaliou os efeitos antibacterianos do óleo essencial de alecrim (OEA) contra cepas padrões de *S.aureus* e *E.coli*. A planta foi cultivada no município de Realeza, PR, tendo seu óleo essencial extraído por meio da técnica de arraste a vapor e sua composição cromatográfica analisada por cromatógrafo de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Nas condições mencionadas, o OEA apresentou rendimento de 1%, 25 componentes químicos e quimiotipo α -pineno (43,94%) e eucaliptol (20,31%) quando obtido no outono pela técnica de arraste à vapor. A avaliação microbiológica evidenciou susceptibilidade bacteriana ao OEA conforme a cepa envolvida nos testes laboratoriais. O OEA apresentou rendimento de 1%, com 25 compostos químicos, tendo o α -pineno (43,94%) e 1,8 cineol (20,31%) como os dois majoritários. Nesta pesquisa, todas as cepas testes de *S. aureus* apresentaram CIMs satisfatórios, porém as CBMs foram elevadas. Em relação às cepas de *E. coli*, houve variação nos valores de CIMs e CBMs conforme a cepa, havendo cepas mais sensíveis (LB25922 e ATCC25922) a ação bacteriostática e bactericida; e cepas mais resistentes (NP0022 e IC) cujos valores, tanto inibitórios quanto bactericidas, foram elevados.

Palavras-chave: Alecrim. *S. aureus*. *E. coli*.

ABSTRACT

The research evaluated the antibacterial effects of rosemary essential oil (OEA) against standard strains of *S. aureus* and *E. coli*. The plant was cultivated in the municipality of Realeza, PR, Brazil, and its essential oil was extracted by steam dragging technique and its chromatographic composition was analyzed by a gas chromatograph coupled to mass spectrometry. Under the conditions mentioned, AEO showed a yield of 1%, 25 chemical components and chemotype α -pinene (43.94%) and eucalyptol (20.31%) when obtained in the autumn by the steam drag technique. The microbiological evaluation showed bacterial susceptibility to AEO according to the strain involved in the laboratory tests. OEA showed a yield of 1%, with 25 chemical compounds, with α -pinene (43.94%) and 1.8 cineole (20.31%) as the two majoritarians. In this study, all test strains of *S. aureus* showed satisfactory MICS, but MBCs were high. Regarding the *E. coli* strains, there was variation in the values of MIC and MBC according to the strain, with strains that were more sensitive (LB25922 and

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, CEP: 85770-000, Realeza, PR, Brasil.

*E-mail: fagner.freitas@uffs.edu.br. Autor para correspondência

ATCC25922) to bacteriostatic and bactericidal action; and more resistant strains (NP0022 and IC) whose values, both inhibitory and bactericidal, were high.

Keywords: Rosemary . *S. aureus*. *E. coli*.

INTRODUÇÃO

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta da família Lamiaceae¹, caracterizado por ser um arbusto perene, ereto, de formato arredondado, com folhas em formato de agulha que são aromáticas e flores azuis claras a brancas minúsculas. A planta é nativa de locais secos e rochosos em áreas mediterrâneas do sul da Europa ao oeste da Ásia, se desenvolve bem em solos rochosos, bem drenados, de neutro a alcalino e com fertilidade média².

Compostos naturais a base de plantas são usados desde a antiguidade e, como os efeitos colaterais são limitados, foram realizados vários estudos para desenvolvimento de medicamentos com o passar do tempo. Além do alecrim ser um candidato potencial em tratamentos Ayurvédicos, também é utilizado como erva culinária devido a sua fragrância, e pode ser utilizado na indústria alimentícia como conservante natural, tendo também uso medicinal e decorativo.³

Muitas biomoléculas são encontradas no óleo essencial de alecrim (OEA), destacando-se os polifenóis, terpenos e flavonóides, porém é difícil associar suas propriedades a compostos isolados, sendo a ação destes sinérgica¹.

Os fitocompostos presentes no alecrim apresentam propriedades quimiopreventivas, antiinflamatórias, antimicrobianas e anti proliferativas, o OEA é bactericida e antioxidante, seu extrato atua como agente antifúngico, antiviral e anti inflamatório que são atividades conferidas pelos compostos fenólicos, ao passo que a ação antioxidante e antimicrobiana é conferida pela presença de flavonoides, terpenoides e ácidos fenólicos, mais especificamente do ácido carnósico e rosmarínico³.

A composição química dos fitocompostos de alecrim varia de acordo com o genótipo do alecrim, sendo influenciada por condições de cultivo, condições ambientais e de extração, além da época da colheita³. Dentre a diversidade química de metabólitos secundários, duas classificações de compostos se destacam, terpenos e fenois são moléculas deficientes em oxigênio ao passo que álcalis são ricos em oxigênio.⁴

Os óleos essenciais (OEs) são resultantes do metabolismo secundário de plantas, e

por terem componentes variados podem exercer maior atividade antimicrobiana se comparados com componentes isolados, assim fica mais difícil de desenvolver resistência bacteriana, uma vez que os OEs atingem diferentes alvos nos patógenos ⁵. É importante ressaltar que os OEs agem de duas formas como agente antimicrobiano: bacteriostático, inibindo o crescimento de bactérias; bactericida, quando adicionado em grande quantidade, leva a morte dos microrganismos, sendo o efeito bacteriostático reversível pela neutralização do agente bacteriano; e o efeito bactericida, irreversível pois causa a morte do microrganismo. ⁵

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil químico e avaliar o potencial do OEA como bacteriostático e como bactericida contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, como o OEA possui alta concentração de compostos como o mirceno, pineno e eucaliptol que atuam como antimicrobianos, este pode ser uma alternativa frente aos problemas de resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos na saúde humana e animal.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e colheita de plantas medicinais

O trabalho foi realizado no período compreendido entre Junho/2023 a Dezembro/2023, na UFFS, Campus Realeza, PR, Brasil. As mudas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram instaladas em 5 linhas com 50m de comprimento, 1,5m entre plantas e 1,5m entre linhas. O solo foi adubado, semestralmente, com 10Mg ha⁻¹ de matéria orgânica constituída por cama de aviário, tendo adubação complementar após a poda (30kg ha⁻¹). A colheita foi realizada por meio de podador elétrico.

Extração do óleo essencial, Densidade Relativa e Análise Cromatográfica

A massa vegetal fresca foi submetida à técnica de destilação por arraste a vapor para obtenção do óleo essencial. A densidade relativa do OEA foi realizada em triplicata pela divisão da massa pelo volume (Densidade = massa/volume) a 20 °C, conforme a metodologia ISO 1342:1998. O OEA foi analisado com cromatógrafo de fase gasosa Agilent MSD 5977, acoplada a espectrometria de massas.

Culturas e microrganismos

Foram usadas cepas padrões de *Staphylococcus aureus* (NP0038, , LB25923, B24 e NP0023) e de *Escherichia coli* (NP0022, ATCC25922 e LB25922) e uma cepa de *E. coli* (isolado clínico - IC) provenientes do Laboratório de Pesquisas NB2 da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, PR.

Padronização do Inóculo

As culturas previamente estocadas em ultrafreezer (-85°C) em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth) glicerinado (60%) foram reativadas e enriquecidas em BHI. Posteriormente, foram transferidas para caldo Mueller Hinton (CMH) e padronizadas para turbidez equivalente 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

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

A CIM é definida como a menor concentração de um composto para inibir o crescimento de um determinado microrganismo, é um parâmetro farmacodinâmico quase hegemônico e muitas vezes o único usado para projetar a antibioticoterapia.⁶ É conhecido que o método de preparação do inóculo, tipo de meio, tamanho do inóculo, temperatura e tempo de incubação podem influenciar nos valores de CIM, devido a isso houve padronização do teste conforme as diretrizes do *Clinical Laboratory Standards Institute* com modificações.

Para a determinação da CIM, foram utilizadas placas de 96 poços, composta por oito linhas indicadas em ordem alfabética de A-H e doze colunas numeradas de 1-12, utilizando três linhas de doze poços para cada cepa de bactéria, conferindo em três triplicatas para cada cepa. Cada placa comportou duas cepas bacterianas. Foram pipetados 100µL de caldo BHI em cada um dos poços utilizados de nº1-12, 100µL de OEA a 50% nos poços nº2, onde foram realizadas diluições seriadas até poço nº11, em que cada poço contém metade da concentração do OEA do poço anterior. Posteriormente, foram pipetados 10µL da cepa bacteriana nos poços 1-11. Sendo assim, os poços da coluna nº1 foram utilizados como o controle positivo para o inóculo e a coluna nº12 foi utilizada como controle negativo conferindo esterilização do meio de cultura.

Após diluições e pipetagem do inóculo ajustado a 0,5 na escala McFarland, a absorbância foi medida em espectrofotômetro na densidade óptica (D.O.) de 625nm para obtenção da absorbância inicial. Em seguida as placas foram incubadas em estufa de crescimento microbiano durante 24 horas a 36 °C com posterior leitura em espectrofotômetro com D.O 625nm.

A CIM foi representada pela diferença na absorbância do OEM na leitura final em comparação a inicial no espectrofotômetro. Tal diferença indica o crescimento e consequentemente a viabilidade da cepa. Para uma confirmação da CIM, foi utilizado a resazurina como indicador de crescimento. Quando a resazurina (azul) não for reduzida a resorufina (rosa) fica constatado o efeito inibitório e quando o corante sofreu modificação para a cor rosa, indicou uma reação de óxido-redução evidenciando a viabilidade celular; a mudança de coloração do azul para rosa foi registrada como crescimento bacteriano^{7,8}. Os procedimentos foram realizados em triplicata e o resultado se deu por média aritmética simples.

A CBM é a estimativa mais comum para avaliar a atividade bactericida e é definida como a menor concentração de um composto capaz de produzir 98% - 99,99% de efeito letal quando comparado a população microbiana inicial.⁹ O teste do CBM foi realizado a partir dos poços onde não houve crescimento no MIC. Aliquotas com 10µL foram semeadas em ágar Mueller Hinton (AMH), seguido de incubação a 35± 2°C/24h (triplicata). Após incubação foram enumeradas as unidades formadoras de colônias (UFC). A concentração mais baixa na qual não houve crescimento bacteriano visível em ágar foi considerado o CBM.

RESULTADOS

Na análise química, o OEA apresentou 1% de rendimento, densidade 0.9 e 25 compostos químicos (Tabela 1), destacando-se o α -pineno (43%) e eucaliptol (20%) por serem os dois componentes majoritários.

Tabela 1 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* cultivado no município de Realeza, sudoeste paranaense, e colhidas no outono, Brasil 2024.

Constituintes químicos	Área relativa (%)
Triciclono	0,22

α -tujeno	0,24
Dihidrosabineno	0,69
β -pineno	2,84
β -mirceno	1,70
α -felandreno	0,29
α -terpineno	0,64
α -felandreno	0,58
p-Cimeno	2,01
γ -Terpineno	1,24
Fenchona	1,02
Crisantenona	1,24
Cânfora	1,84
Endo-Borneol	1,31
Acetato de isononila	0,33
Terpinen-4-ol	0,62
α -Terpineol	1,43
Geraniol	0,95
Acetato de bornila	0,8
β -cariofileno	1,38
Verbenona	3,4
Limoneno	4,21
Canfeno	5,74
1,8 cineol	20,31
α -pineno	43,94
Total	99,78%

Na Tabela 2, é possível observar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) e Bactericidas Mínimas (CBM) do OEA sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No caso das cepas de *S. aureus*, o OEA apresentou CIMs variando entre 2,8% e 6,25%; e CBMs variando entre 16,6% e 25%. Já para as cepas de *E. coli*, os valores de CIMs variaram entre 3,13% e 25%; e CBMs variando entre 4,17% e 25%, conforme a cepa.

Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do OEA, expressos em porcentagem (%) e µg/µl, contra cepas padrões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, Realeza, sudoeste paranaense, Brasil, 2024.

Microrganismos	CIM		CBM	
	%	(µg/µl)	%	(µg/µl)
Cepas de <i>S.aureus</i>				
LB25923	6,25	56250	16,6	149400
NP0038	3,13	28170	25	225000
B4	2,8	25,200	25	225000
Cepas de <i>E.coli</i>				
NP0022	12,5	112500	12,5	112500
LB25922	4,17	37530	4,17	37530
ATCC25922	3,13	28170	4,17	37530
IC	25	225000	12,5	225000

DISCUSSÃO

O OEA avaliado no presente trabalho apresentou rendimento e densidade satisfatórios para o desenvolvimento das análises microbiológicas. De maneira geral, o OEA preconizado pela ISO 1342 apresenta o α -pineno e 1,8 cineol como componentes majoritários, alterando suas concentrações e quantidade de componentes químicos conforme o país. No presente estudo, o OEA apresentou os mesmos componentes químicos majoritários preconizados pela ISO 1342, tendo quimiotipo α -pineno (43,94%) cujas concentrações foram superiores quando comparadas com o OEA espanhol (18 a 26%), Tunisiano e Marroquino (9 a 14%). Embora o

1,8 cineol (20.31%) esteja dentro dos limites estabelecidos para o OEA espanhol (17 a 25%), suas concentrações foram inferiores ao preconizado para o OEA tunisiano e marroquino (38 a 55%).

A variação na composição e concentração do OEA é influenciado pela estação climática, período da colheita, partes da planta colhidas (folhas, caule, partes aéreas e flores), condições ecológicas da área de cultivo e processos pós-colheita, tais como armazenamento e transporte. No trabalho realizado por Koçaq et al.⁴ analisando OEA turco, os autores observaram quimiotipo 1,8 cineol (35,36%), porém sem a presença de α -pineno na composição. Considerando que o OEA teste foi obtido no outono, existe a possibilidade de alteração dos componentes químicos, e suas respectivas concentrações, numa colheita realizada em outra estação climática.

O α -pineno e o 1,8 cineol são monoterpenos que representam os principais compostos orgânicos voláteis emitidos pelas plantas da família Lamiaceae¹⁶⁻¹⁷. Neste trabalho, o α -pineno e o β -pineno, encontrados nesta pesquisa representando 46,78% da composição total, são dois isômeros estruturais do pineno com diversos relatos de efeitos antibióticos contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*¹⁰⁻¹³. O 1,8-cineol também demonstrou atividade antibacteriana contra várias cepas patogênicas Gram-positivas, incluindo *S. aureus*, assim como cepas Gram-negativas, como *E. coli*, devido à sua capacidade de comprometer a permeabilização da membrana celular, além de causar regulação negativa de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e proteínas de membrana no nível de mRNA¹⁸⁻²⁰. Na pesquisa de Liu¹⁹, o 1,8-cineol mudou a forma e o tamanho da célula bacteriana Gram-negativa e positiva, havendo apoptose (*S. aureus*) e necrose (*E. coli*). Os estudos desses autores mostraram que o 1,8-cineol tem um efeito melhor contra *E. coli* porque, ao contrário do *S. aureus*, suas células romperam a parede celular e a membrana devido à sua hidrofobicidade, tornando as bactérias com membrana externa de lipopolissacarídeo suscetíveis a esse composto.

Nesta pesquisa, todas as cepas testes de *S. aureus* apresentaram CIMs satisfatórios (2,8% a 6,25%), porém consideramos a CBMs elevada (16,6% a 25%), principalmente, quando projeta-se o desenvolvimento de produtos medicamentosos sem comprometer a estabilidade das fórmulas. No caso das cepas de *E. coli*, houve variação nos valores de CIMs e CBMs conforme a cepa, sendo evidente que as cepas LB25922 e ATCC25922 foram mais sensíveis a ação bacteriostática e bactericida do OEA quando comparadas com as cepas NP0022 e IC cujos valores, tanto inibitórios quanto bactericidas, foram elevados.

O baixo custo de produção associado à fácil adaptação da planta ao solo brasileiro e considerável atividade antimicrobiana comprovada, cientificamente, torna o OEA um importante produto para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, podendo agir como antimicrobiano natural ou restaurar a eficácia de medicamentos com ação comprometida ao longo dos anos, diminuindo sua CIM e ativando, novamente, seu efeito terapêutico.

CONCLUSÃO

O OEA proveniente das plantas cultivadas no município de Realeza, sudoeste do Paraná, apresentou rendimento de 1% na técnica de extração por arraste a vapor no período de outono, com 25 compostos químicos, tendo o α -pineno (43,94%) e 1,8 cineol (20,31%) como os dois constituintes majoritários. Nesta pesquisa, todas as cepas testes de *S. aureus* apresentaram CIMs satisfatórios, porém as CBMs foram elevadas. Em relação às cepas de *E. coli*, houve variação nos valores de CIMs e CBMs conforme a cepa, havendo cepas mais sensíveis (LB25922 e ATCC25922) a ação bacteriostática e bactericida; e cepas mais resistentes (NP0022 e IC) cujos valores, tanto inibitórios quanto bactericidas, foram elevados.

REFERÊNCIAS

1. De Macedo, L.M.; Santos, É.M.D.; Militão, L.; Tundisi, L.L.; Ataíde, J.A.; Souto, E.B.; Mazzola, P. G. *Plants (Basel)* **2020**, 9, 651. [<https://doi.org/10.3390/plants9050651>].
2. Leporini, M.; Bonesi, M.; Loizzo M.R; Passalacqua N.G; Tundis R. *Plants (Basel)*. **2020**, 9, 798. [[10.3390/plants9060798](https://doi.org/10.3390/plants9060798)].
3. Singh, D.; Mittal, N.; Mittal, P.; Siddiqui, M.H. *Molecular Biology Reports*. **2024**, 51, 757. [<https://doi.org/10.1007/s11033-024-09685-1>].
4. Koçak, M.Z; Karadağ, M; Çelikkan, F. *Journal of Agriculture*. **2021**, 4, 39. [<https://doi.org/10.46876/ja.938170>].
5. Contrucci; B.S.; Rosimeire-Junior, R.; Kozusny-Andreani; D. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. **2019**, 23, 180. [<http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2019v23n3p180-184>].
6. Udekwu, K.I; Parrish, N; Ankomah, P; Baquero, F; Levin, B.L. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **2009**, 63,745. [<https://doi.org/10.1093/jac/dkn554>].
7. Reller, L.B; Weinstein, M; Jorgensen, J.H; Ferraro, M.J. *Clinical Infectious Diseases*, **2009**, 11, 1749. [<https://doi.org/10.1086/647952>].
8. Schumacher, A; Vranken, T; Malhotra, A; Arts, J.J.C; Habibovic, P. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **2018**, 37, 187. [<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>].
9. Hoch, C.C; Petry, J; Griesbaum, L; Weiser, T; Werner, K; Ploch, M; Verschoor, A; Multhoff, G; Bashiri Dezfouli, A; Wollenberg, B. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **2023**, 167, 115467. [<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115467>].

10. CLSI. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; *Approved Guideline M26-A*, Wayne, PA, USA, **1999**. acesso em 25 de outubro de 2024
11. Salehi, B; Upadhyay, S; Orhan, I.E.; Jugran, A.K.; Jayaweera, S.L.D; Dias, D.A.; Sharopov, F; Taheri, Y; Martins, N; Baghalpour, N; Cho, W.C; Sharifi-Rad, J. *A Miracle Gift of Nature. Biomolecules*. **2019**, 11, 738. [<https://doi.org/10.3390/biom9110738>].
12. Zielińska-Błajet, M.; Feder-Kubis, J. *International Journal Molecular Science*. **2020**, 19, 7078. [<https://doi.org/10.3390/ijms21197078>].
13. Allenspach, M.; Steuer, C. *Phytochemistry*. **2021**, 190, 112857. [<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>].
14. Fazo, M.L.S.; ROBERIS, M.G.; SILVA DE ALMEIDA, V.; ALBERTO PIVETA, H.. *Revista Interciência* **2022**, 1, 12. [<https://www.fafica.br/revista/index.php/interciencia/article/view/452>].
15. Lisboa, Fernando Paixão. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de manjerição, alecrim e capim limão sobre agentes causadores de endometrites em éguas. *Universidade Estadual Paulista*, **2021**. [<http://hdl.handle.net/11449/204771>].
16. Sichieri, Francini C. Passos; De Assis Kretzl, Francisco; Bonapaz, Rubia. **2019**. [<https://repositorio.camporeal.edu.br/index.php/biomed/article/view/347>].
17. Oliva, Maria de Las Mercedes; Lorello, Inés María; Baglio, Carla; Posadaz, Ariana; Carezzano, Maria Evangelina; Paletti Rovoy, MF; Huallpa, CL; Juliani, HR. *Journal of Medicinally Active Plants*. **2023**, 12; 38. [[Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of rosemary \(Salvia rosmarinus Spenn.\) essential oils from Argentina](#)] acesso em novembro de 2024.
18. Sales, Albofazel Jafari; Pashazade, Mehrdad. *Revista Internacional de Ciências da Vida e Biotecnologia*, **2020**, 3, 62. [<http://dx.doi.org/10.38001/ijlsb.693371>].
19. Liu, Ting; Wang, Jingfan; Gong, Xiaoman; Wu, Xiaoxia; Liu, Liu; Xi, Fumin. *Journal of Food Protection*, **2020**, 83, 1261. [<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-337>].
20. Mączka, W;Duda-Madej, A; Górný, A; Grabarczyk, M; Wińska, K. *Molecules*. **2021**, 26, 4933. [<https://doi.org/10.3390/molecules26164933>].
21. Silva, Keila de Cássia Ferreira de Almeida. Avaliação do uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana como conservantes em formulações farmacêuticas. Pós Graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, *Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, **2011**. [<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7780>]. acesso em dezembro de 2024