

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS
DE CITROS SOBRE O CRESCIMENTO DE
MICROORGANISMOS**

TAMARA CUBIAKI PIRES

2007

TAMARA CUBIAKI PIRES

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITROS SOBRE O
CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a
obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pires, Tamara Cubiaki.

Efeito inibitório de óleos essenciais de citros sobre crescimento de
microrganismos / Tamara Cubiaki Pires. -- Lavras : UFLA, 2007.
61p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Óleo essencial. 2. Citros. 3. Bactérias. 4. Levedura. 5. Fungo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

TAMARA CUBIAKI PIRES

**EFEITO INIBITÓRIO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CITROS SOBRE O
CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 10 de agosto de 2007.

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

Prof. Dr^a. Maria das Graças Cardoso

UFLA

Profa. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

A Deus, pela presença constante em minha vida.

À minha mãe, Eva e meu pai, José Silvio, por serem meu exemplo de vida e alicerce.

A minha irmã, Tatiana, pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu amor, Anderson, que, de uma forma toda especial, me motivou na realização desta conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli, pela oportunidade, orientação, dedicação e presença constante.

À professora Dr^a. Maria das Graças Cardoso e Ana Paula Soares Pinto Salgado, do Departamento de Química, pela disponibilidade e grande ajuda.

Ao professor Dr. José Darlan Ramos, pelo fornecimento dos limões para a extração dos óleos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela cooperação e ensinamentos.

Ao professor Paulo Roberto Clemente, pelo apoio e incentivo.

Ao professor Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pelo apoio e colaboração.

À Roberta Bessa, pela ajuda nas análises estatísticas.

A Magda, Ivani e Eliane, pessoas de quem recebi importante apoio.

Aos colegas de Laboratório, Danila, Danilo, Cleube, Juliana, Gisele, Rosilane, Simone, Vitor e Nélio, pela colaboração.

A Milagros, pela ajuda e boa vontade.

Aos colegas do mestrado, Ligiane, Pedro, Sandra, Rogério, Danila, Fernanda, Louise, Cíntia e Vivian, pelos bons momentos.

Ao ex-professor da UFLA e Superintendente Municipal de Abastecimento de Lavras, Dr. Waldenor da Rocha Gomes, pelo incentivo, apoio e orientação.

Ao Secretário Municipal de Agricultura de Lavras, Eduardo Luis Marani, pela oportunidade.

Aos funcionários da Secretaria Municipal de Agricultura e Abastecimento de Lavras, Toninho, Boi, Claret, Cida, Mônica, Lúcia Helena e César (*in memoriam*), pelo companheirismo e compreensão.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Óleos essenciais.....	3
2.2 Óleos essenciais de citros.....	5
2.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	7
2.4 Microrganismos presentes em alimentos.....	9
2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4.2 <i>Escherichia coli</i>	11
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.4.4 <i>Candida utilis</i>	13
2.4.5 <i>Penicillium expansum</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Extração dos óleos essenciais.....	15
3.2 Atividade dos óleos e microrganismos utilizados.....	15
3.3 Preparação do inóculo.....	16
3.4 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias e leveduras.....	17
3.5 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre fungo.....	17
3.6 Análise estatística.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20

4.1 Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
4.2 Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre <i>Candida utilis</i>	30
4.3 Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre <i>Penicillium expansum</i>	35
5 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (casca e folha) sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	21
TABELA 2	Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (casca e folha) sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> ...	25
TABELA 3	Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (casca e folha) sobre a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
TABELA 4	Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (folha e casca) sobre a levedura <i>Candida utilis</i>	31
TABELA 5	Resultados médios do crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> pelos óleos essenciais de citros.....	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Aspecto geral das folhas e frutos de <i>Citrus aurantifolia</i> (Chrst.) Swingle (limão-galego) (A), de <i>Citrus limonia</i> Osbeck (limão-cravo) (B), e <i>Citrus latifolia</i> Tanaka (limão-tahiti) (C)	6
FIGURA 2	Estrutura química do Limoneno (A), Citral (B) e Linalool (C)	7
FIGURA 3	Estrutura química da patulina	14
FIGURA 4	Halos formados pela inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> pelos óleos essenciais da folha do lima- cravo (A) e da casca do lima- tahiti (B).....	21
FIGURA 5	Halos de inibição sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em função das concentrações dos óleos essenciais de citros.....	23
FIGURA 6	Halos formados pela inibição do crescimento de <i>Escherichia coli</i> , pelos óleos essenciais da folha do limão-cravo (A) e da casca do limão-galego (B).....	24
FIGURA 7	Halos de inibição sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> em função das concentrações para o óleo essencial de limão-cravo (folha + casca).....	26
FIGURA 8	Halos de inibição sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> em função das concentrações para o óleo essencial de limão-galego (folha + casca).....	26
FIGURA 9	Halos de inibição sobre a bactéria <i>Escherichia coli</i> em função das concentrações para o óleo essencial de limão-tahiti (folha + casca).....	27
FIGURA 10	Halos formados pela inibição do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , pelos óleos essenciais da casca (A) e da folha do limão-galego (B).....	28

FIGURA 11	Halos de inibição sobre a bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função das concentrações dos óleos essenciais de citros.....	30
FIGURA 12	Halos formados pela inibição do crescimento de <i>Candida utilis</i> , pelos óleos essenciais da folha do limão-galego (A) e da folha do limão-tahiti (B).....	31
FIGURA 13	Halos de inibição sobre a levedura <i>Candida utilis</i> em função das concentrações dos óleos essenciais da casca e da folha de limão-cravo.....	33
FIGURA 14	Halos de inibição sobre a levedura <i>Candida utilis</i> em função das concentrações dos óleos essenciais da casca e da folha de limão-galego.....	34
FIGURA 15	Halos de inibição sobre a levedura <i>Candida utilis</i> em função das concentrações dos óleos essenciais da casca e da folha de limão-tahiti.....	34
FIGURA 16	Crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> pelo óleo essencial da casca do limão-cravo (A) e inibição micelial do fungo pelo óleo essencial da folha do limão-galego (B).....	36
FIGURA 17	Crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das concentrações para o óleo essencial de limão-cravo (casca e folha).....	38
FIGURA 18	Crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das concentrações para o óleo essencial de limão-galego (casca e folha).....	39
FIGURA 19	Crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das concentrações para o óleo essencial de limão-tahiti (casca e folha).....	39

RESUMO

PIRES, Tamara Cubiaki. **Efeito inibitório de óleos essenciais de citros sobre o crescimento de microrganismos** 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

A atual tendência dos órgãos legisladores de produção de alimentos e dos consumidores tem exigido uma progressiva retirada de aditivos químicos na produção de alimentos. Os óleos essenciais encontrados em plantas medicinais, aromáticas e condimentares têm interessado às indústrias alimentícias como uma alternativa aos aditivos sintéticos. Os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias deterioradoras e ou patogênicas, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos. A produção de limão, além de destinar-se ao consumo “*in natura*” e à indústria de sucos, destina-se também à extração do óleo essencial. No intuito de avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais da casca e da folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), experimentos foram realizados, em laboratório, utilizando-se o método de difusão cavidade placa ágar com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e com a levedura *Candida utilis*. Para o fungo *Penicillium expansum*, foi observado o crescimento e ou a inibição micelial da cultura fúngica, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo). Nos resultados dos testes *in vitro*, os óleos essenciais testados promoveram inibição de todos os microrganismos testados, porém, apresentaram melhor formação dos halos de inibição sobre a levedura *Candida utilis*. Para as bactérias, os óleos promoveram melhor inibição sobre *Staphylococcus aureus* do que em *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O efeito inibitório dos óleos de citros foi efetivo sobre o fungo *Penicillium expansum*, porém, o óleo essencial da casca do limão-cravo estimulou o crescimento micelial do fungo. Foi possível verificar que os óleos em estudo possuem efeito inibitório sobre os microrganismos estudados, o que permite afirmar que os óleos essenciais são uma alternativa para o controle microbiológico de microrganismos e para a obtenção de alimentos naturais.

¹ Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA

ABSTRACT

PIRES, Tamara Cubiaki. **Inhibitory effect of essential oils of citros on the growth of microorganisms.** 2007. 61 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. ¹

The current trend adopted by the lawmaking agencies of food production and consumers has demanded a progressive removal of chemical additives in food production. The essential oils found in medicinal, aromatic and seasoning plants have interested to the food industries as an alternative to synthetic additives. Essential oils present an antimicrobial activity against a great number of decaying and/or pathogenic bacteria, including species resistant to antibiotics and antifungal. Lemon production, in addition to destined to “*in natura*” consumption and juice industry, meant also for the extraction of the essential oil. With the purpose of evaluating the inhibitory effect of essential oils of the rind and leaf of e *Citrus limonia* Osbeck (Cravo-lemon), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (Galego-lemon) and *Citrus latifolia* Tanaka (Tahiti-lemon), experiments were accomplished in laboratory by utilizing the agar dish hole diffusion method with bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and with yeast *Candida utilis* For the fungus *Penicillium expansum*, important food –decaying pathogens. In the results of the *in vitro* tests, essential oils tested promoted the inhibition of all the tested microorganisms; but, they presented the best formation of inhibition haloes on yeast *Candida utilis*. For the bacteria, the oils promoted better inhibition on *Staphylococcus aureus* than on *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The inhibitory effect of the citros oils was effective on fungus *Penicillium expansum*; but the essential oil of the Cravo-lemon rind stimulated the mycelial growth of the fungus. It was possible to verify that the oils in study possess inhibitory effect on the studied microorganisms, which enables to corroborate that essential oils are an alternative in the biologic control of microorganisms, its being an alternative to obtaining natural foods.

¹ Adviser: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A atual tendência adotada pelos órgãos legisladores de produção de alimentos e consumidores tem exigido uma progressiva retirada de aditivos químicos adicionados nos alimentos. Essa tendência tem conduzido a indústria de alimentos a buscar compostos que lhe permitam alcançar suas metas relacionadas à estabilidade microbiana dos seus produtos finais em relação à ação de microrganismos deteriorantes e ou patogênicos. Impulsiona também essa busca a preocupante realidade com o progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos, em todos os campos de estudo da microbiologia.

A utilização de substâncias naturais torna o alimento mais atrativo ao consumidor, pelo fato de elas proporcionarem benefícios à saúde, bem como menores impactos ao meio ambiente. Os óleos essenciais encontrados em plantas têm interessado às indústrias alimentícias como uma alternativa aos aditivos sintéticos, em que seriam utilizados como métodos adicionais no controle de microrganismos por apresentarem propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. Assim, o estudo sobre o efeito inibitório desses óleos em microrganismos é uma alternativa para a redução do uso de aditivos químicos em alimentos.

Os alimentos podem apresentar diversos microrganismos, muitas vezes patogênicos, os quais poderão sintetizar substâncias tóxicas, prejudiciais se ingeridas pelo homem ou animal, ou também deteriorantes, causando diversos prejuízos para as indústrias.

Entre as plantas aromáticas, o limão, além de destinar-se ao consumo *in natura* e à indústria de suco, também é utilizado para a extração do óleo essencial. Esse óleo é comumente utilizado por indústrias de bebidas, como

também para a fabricação de cosméticos e essências aromáticas e na culinária. A atividade antimicrobiana desse óleo tem sido avaliada contra bactérias patogênicas e deterioradoras, leveduras e fungos filamentos toxigênicos.

Diante do exposto, com o presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito inibitório dos óleos essenciais extraídos da casca e da folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) sobre o crescimento de bactérias, fungos e leveduras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são líquidos oleosos aromáticos obtidos de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, ramos, madeira, frutas e raízes). Eles podem ser obtidos por prensagem, enfloração ou extração, mas o método de destilação a vapor é o mais usado para a obtenção comercial de óleos essenciais (Burt, 2004).

De forma geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo assim dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes (Pereira, 2006).

Eles podem possuir mais de sessenta componentes individuais (Senatore, 1996; Russo et al., 1998) e os principais podem constituir até 85% do óleo, considerando que os outros componentes só estão presentes como traço (Senatore, 1996). Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (Simões et al., 2004).

O uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância devido ao fato de eles apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o ataque de microrganismos, demonstrando eficiência nas funções antioxidantes, anti-radicais e antimicrobianas em alimentos (Pereira, 2006). A atividade antimicrobiana depende do tipo, da composição e da concentração da espécie ou do óleo

essencial, do tipo do microrganismo em questão, da composição do substrato, do processamento e da condição de estocagem (Marino et al., 2001).

Além de propriedades antibacterianas (Mourey & Canillac, 2002), os óleos essenciais, ou seus componentes, têm sido estudados por apresentarem propriedade antimicótica (Jayashree & Subramanyam, 1999; Mari et al., 2003), antitoxigênica (Ultee & Smid, 2001), antiparasítica (Pessoa et al., 2002), e inseticida (Karpouhtsis et al., 1998). Essas características estão relacionadas, possivelmente, à função dos componentes nas plantas (Mahmoud & Croteau, 2002).

Os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana contra grande número de bactérias deterioradoras e ou patogênicas, incluindo espécies resistentes a antibióticos. Eles podem apresentar ação tanto contra bactérias gram-positivas quanto gram-negativas e, ainda, leveduras e fungos filamentosos micotoxigênicos e ou deterioradores (Caccioni et al., 1998; Prashar, et al., 2003).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para determinado órgão e característica do seu estágio de desenvolvimento. Contudo, as condições ambientais são capazes de causar variações, como a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo também influenciam a composição química dos óleos essenciais (Willians & Stockley, 1998; Burt, 2004). Sua composição também pode diferir entre as estações de colheitas e condições geográficas (Cosentino et al., 1999; Faleiro et al., 2002).

Os óleos essenciais são voláteis, sendo necessário seu armazenamento em recipientes herméticos em ausência de luz, para prevenir a ocorrência de mudanças em sua composição.

2.2 Óleo essencial de citros

O gênero *Citrus*, com aproximadamente 16 espécies da família Rutaceae, inclui as mais bem conhecidas e importantes de todas as frutas tropicais e subtropicais (Figura 1). Atualmente, todas as frutas cítricas são cultivadas em ampla escala, particularmente nas regiões subtropicais; embora o gênero seja, principalmente, de origem tropical, as frutas cítricas são populares por todo o mundo (Svoboda, 2003).

A produção de limão, além de destinar-se ao consumo *in natura* e à indústria de sucos, destina-se também à extração do óleo essencial contido em sua casca. Este óleo é comumente utilizado por indústrias de bebidas de refrigerantes e também para a fabricação de cosméticos e de essências aromáticas e, ainda, na culinária, entre outros (Grassi Filho et al., 2005).

Pesquisas limitadas têm sido realizadas sobre os óleos essenciais de citros, em termos de seu uso como agente antimicrobiano em alimentos. Porém, esses compostos têm demonstrado possuir propriedades antimicrobianas potenciais não somente sobre leveduras e bactérias produtoras de esporos, mas também sobre bactérias que causam deterioração em alimentos (Fisher & Philips, 2006).

A determinação do teor de óleo essencial em frutos de limão é um assunto importante, mas, até o momento, mereceu pouca atenção, talvez pela pequena fatia do mercado de frutos cítricos destinados à extração de óleo essencial ou pela dificuldade de se trabalhar com espécies cítricas que apresentam de três a quatro florescimentos por ano (Grassi Filho et al., 2005).

O óleo essencial de limão é uma mistura complexa de combinações químicas, como limoneno, γ -terpineno, citral, linalool e β -cariofileno (Figura 2), entre outros que podem ser representados como uma mistura de hidrocarbonetos

do grupo de terpenos e sesquiterpenos, compostos oxigenados como aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, fenóis, lactonas e uma pequena percentagem de



FIGURA 1 Aspecto geral das folhas e frutos de *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) (A), de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo) (B) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) (C).

parafinas e ceras (Benvenuti et al., 2001). O limoneno é considerado um dos componentes majoritários dos óleos cítricos, com concentração de 88% a 95% no limão (Moufida & Marzouk, 2003). O componente mais significativo do flavour é o citral, enquanto que o linalol é outro terpeno importante na determinação da intensidade da fragrância, que apresenta característica

organoléptica altamente distinta e é importante na atividade antimicrobiana. O citral foi destacado como um composto ativo em óleos de frutas cítricas, especialmente na deterioração causada por *Penicillium digitatum* (Caccioni et al., 1998).

Os óleos essenciais de *Citrus* alteram as propriedades organolépticas dos gêneros alimentícios e isso é importante, pois pode torná-lo depreciável ao consumidor. Uma maneira de combater este problema é usar o óleo extraído por arraste a vapor. Outro fator que deve ser considerado é que os óleos essenciais são compostos por substâncias voláteis e, conseqüentemente, seu uso como antimicrobianos pode ter vida útil limitada, pois eles evaporam rapidamente (Fisher & Philips, 2006).

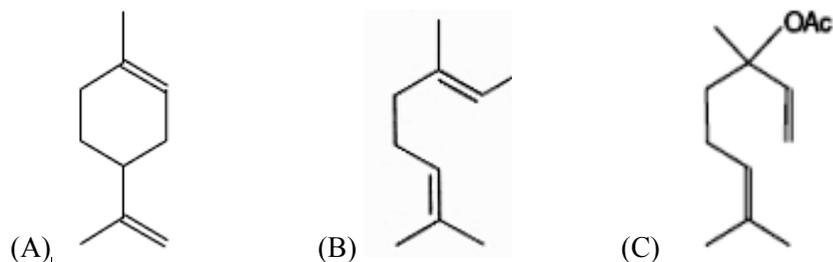


FIGURA 2 Estrutura química do limoneno (A), do citral (B) e do linalol (C)

2.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Testes de atividade antimicrobiana podem ser classificados como difusão, diluição ou métodos bioautográficos. Os princípios e a prática desses métodos são explicados na literatura, mas parece que nenhum teste padronizado tem sido desenvolvido para avaliar a atividade antimicrobiana de possíveis preservativos contra microrganismos relacionados a alimentos, embora a

necessidade para tal tenha sido apontada (Burt, 2004). Além disso, o resultado do teste pode ser afetado por fatores como o método usado para extrair o óleo essencial do material vegetal, a concentração do inóculo, a fase de crescimento do microrganismo, o meio de cultura usado, o pH do meio e o tempo de incubação e de temperatura (Burt, 2004).

Embora as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e seus componentes tenham sido estudados desde o passado, com o primeiro experimento feito por De la Croix, em 1881, o mecanismo de ação não foi estudado com grandes detalhes (Lambert et al., 2001; Burt, 2004).

Considerando o grande número de diferentes grupos químicos presentes nos óleos essenciais, é provável que sua atividade antimicrobiana não seja atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários mecanismos na célula (Carson et al., 2002).

Uma característica importante dos óleos essenciais e seus componentes é sua hidrofobicidade, a qual permite quebrar os lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocôndria, desorganizando as estruturas, tornando-as mais permeáveis (Sikkema et al., 1994), acarretando em vazamento de íons e outros conteúdos celulares (Ultee & Smid, 2001; Carson et al., 2002). Embora o extravasamento de certo volume de conteúdo intracelular da célula bacteriana possa ser tolerado sem perda de sua viabilidade, grandes volumes de conteúdo celular ou a saída de moléculas críticas e íons podem conduzir à morte (Burt, 2004).

Os componentes dos óleos essenciais também parecem atuar sobre as proteínas mergulhadas na membrana citoplasmática. Enzimas como ATPases são conhecidas por se localizar na membrana citoplasmática e serem envolvidas por moléculas de lipídeos. Dois possíveis mecanismos têm sido sugeridos, por meio dos quais, o hidrocarboneto cíclico poderia agir. Moléculas de hidrocarboneto lipofílico poderiam acumular-se na bicamada lipídica, alterando

a interação lipídeo–proteína; alternativamente, uma interação direta dos componentes lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína seria possível (Sikkema et al., 1995). Alguns óleos essenciais têm sido estudados por estimular o crescimento de pseudomicelia (uma série de células que aderem umas a outras, como resultado de separação incompleta de células formadas recentemente) em certas leveduras. Isso poderia ser uma indicação da ação dos óleos essenciais sob enzimas envolvidas na energia de regulação ou na síntese de componentes estruturais (Burt, 2004).

Canillac & Mourey (2001) estudaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Picea excelsa* sobre *Listeria* sp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Esses autores observaram que o MIC variou de 0,015% a 0,067%, para *Listeria*, de 0,022% a 0,061%, para *Staphylococcus aureus* e, para *Escherichia coli*, foi observado crescimento até a concentração de 16% do óleo.

Fisher & Philips (2006) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de limão, laranja, bergamota na sobrevivência de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus in vitro* e em sistemas alimentares. Foi observado que todos os óleos foram mais efetivos sobre bactérias gram-positivas em detrimento das gram-negativas.

Pinto et al. (2007) avaliaram a susceptibilidade de algumas espécies de leveduras e fungos filamentosos ao óleo essencial de *Salvia officinalis* e notaram grande eficácia sobre o gênero *Candida* e sobre fungos dermatófitos, obtendo valores de concentração inibitória mínima (MIC) de 0,63 µL/mL, para os dermatófitos.

2.4 Microrganismos presentes em alimentos

A ingestão de alimentos contaminados por microrganismos ou suas toxinas pode causar toxinfecções ao homem ou animais (Pereira, 2006).

Os alimentos devem ser elaborados a partir de padrões sanitários que apresentem boa qualidade e segurança física, química e biológica. No caso das toxinfecções alimentares, o enfoque ocorre na contaminação bacteriana, uma vez que essa é a maior causa desse tipo de enfermidade (Santos, 2004).

Nos alimentos podem ser encontradas bactérias deterioradoras e patogênicas, bem como fungos filamentosos toxigênicos e deterioradores e leveduras patogênicas.

As leveduras são contaminantes comuns de frutas e representam grande problema para as indústrias de processamento, devido à habilidade de crescer em baixo pH e alto conteúdo de açúcar. De acordo com vários estudos, leveduras contaminantes são freqüentemente isoladas de frutas frescas e processadas e de suco de frutas (Restuccia et al., 2006).

Muitos tipos diferentes de alimentos estão propensos à deterioração microbiana e, em muitos casos, essa deterioração é causada pelo crescimento indesejado de fungos. Além do seu envolvimento em deterioração de alimentos, fungos são patógenos humanos importantes. Fungos deterioradores de alimentos podem afetar uma variedade de alimentos processados, incluindo pão, cereais, especiarias, produtos lácteos, como queijo e margarina, molhos, chocolate, molhos fermentados (soja), bebidas, frutas e xaropes de fruta de alto-açúcar (Smits & Brul, 2005).

Os óleos essenciais de várias espécies de plantas podem atuar como agentes naturais na preservação de alimentos e serem acrescentados durante o seu processamento, inibindo o crescimento de bactérias e fungos (Pereira, 2006).

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o maior causador de toxiose alimentar em humanos, pois produz compostos extracelulares, como as enterotoxinas

estafilocócicas, coagulases, nucleases e lipases. Quando presentes no alimento, podem excretar enterotoxinas, causando toxiose no indivíduo após a ingestão do alimento contaminado (Fueyo et al., 2005). As enterotoxinas são as responsáveis pelas toxioses e, em particular, na área de vigilância sanitária de alimentos, são a maior causa de surtos de toxinfecção durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos (Santos, 2004).

Em humanos, o hábitat principal do *Staphylococcus aureus* é a mucosa nasofaríngea, onde faz parte da microbiota normal. Os organismos presentes no nariz podem contaminar a pele, assim os portadores nasais podem ser portadores cutâneos e, com isso, transmitidos facilmente para alimentos processados manualmente.

Entre os principais alimentos, capazes de proporcionar o desenvolvimento natural do *Staphylococcus aureus*, estão os produtos lácteos, como os queijos, leite cru ou pasteurizado, manteiga e sorvetes, produtos de confeitaria, como bolos recheados, tortas e doces cremosos, carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (Santos, 2004).

2.4.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa e um dos habitantes mais comuns do trato intestinal. Sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal, porém, não é normalmente considerada patogênica, apesar de ser a responsável por infecções urinárias e produtora de enterotoxinas, causando graves doenças de origem alimentar (Tortora, 2000).

O organismo coloniza tipicamente a área gastrintestinal infantil dentro de poucas horas de vida, seguido pelo benefício mútuo entre *E. coli* e o hospedeiro. Normalmente, a bactéria permanece inofensivamente limitada ao lúmen

intestinal sobre as superfícies das mucosas ou pode disseminar-se ao longo do corpo (Nataro & Kaper, 1998). Porém, em hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, espécies de *E. coli* consideradas não patogênicas podem causar infecção ao violarem as barreiras gastrintestinais.

A *Escherichia coli* pode ser encontrada em alimentos elaborados à base de carne, leite não pasteurizado e derivados, vegetais crus e minimamente processados. Leite e derivados também podem sofrer contaminação direta ou indireta por esse microrganismo e as hortaliças e frutas podem ser contaminadas pelo adubo, durante a irrigação ou durante o processamento, como na lavagem e no resfriamento (McEvoy et al., 2003; Lira et al., 2004; Islam et al., 2005).

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* pode ocorrer em solo, fezes de animais, água e também em alimentos e está possivelmente envolvida em enterites, transmitidas por água e alimentos. Pode ser isolada de infecções no trato respiratório e urinário, feridas e queimaduras. A bactéria está envolvida na etiologia de mastites e outras doenças infecciosas de humanos e animais (Szita et al., 1998).

Esse microrganismo é um importante patógeno oportunista humano capaz de causar infecções invasivas severas em pacientes com fibrose cística, neutropenia ou imunossupressão iatrogênica. Infecções causadas por *P. aeruginosa* são problemáticas para pacientes hospitalizados, particularmente em unidades de terapias intensivas. Essa espécie bacteriana produz vasto aparato de fatores de virulência extracelular, o qual é regulado por densa população celular via comunicação célula-célula ou *quorum sensing* (Kim & Wei, 2007).

Essa bactéria pode crescer em ambientes com baixos nutrientes. Na verdade, tem sido detectada em ambientes aquáticos naturais, água de torneira e

soluções salinas (Legnani et al., 1999). *Pseudomonas aeruginosa* também pode atacar uma variedade de superfícies e uma variedade de nichos, inclusive ambiente de processamento de alimentos, formando biofilmes, tornando-se mais resistente a ambientes de estresse, agentes sanificantes e antimicrobianos (Van Houdt et al., 2004).

2.4.4 *Candida utilis*

As leveduras podem causar deterioração de comida por consumir ácidos orgânicos e espécies de *Candida* têm mostrado ser contaminantes da flora de alimentos (Cássio & Leão, 1991).

As leveduras do gênero *Candida* podem causar uma variedade de síndromes em humanos, desde infecções superficiais até invasoras, principalmente em imunocomprometidos (Silva & Candido, 2005).

As principais espécies de interesse clínico são: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* e *Candida lusitanae*. Entretanto, um número progressivo de casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas e espécies emergentes de *Candida* tem sido descritos, envolvendo isolamentos de *Candida dubliniensis*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa*, *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida lipolytica*, *Candida norvegensis*, *Candida inconspícua*, entre outras (Colombo & Guimarães, 2003).

A levedura *Candida utilis* é industrialmente importante e não associada à doença humana (Kondo et al., 1995). O primeiro caso de candidemia associada a cateteres em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), causada por *Candida utilis*, foi apresentado por Alsina et al. (1988). Caso de fungemia persistente em paciente sem AIDS, sem neutropia ou cateter central, associada a *Candida utilis*, foi reportado por Bougnoux et al. (1993).

2.4.5 *Penicillium expansum*

Penicillium expansum é um dos fungos mais comuns envolvido na deterioração de maçãs, pêssegos, pêras ou cerejas, conduzindo a perdas econômicas importantes na indústria de frutas. Além de perdas de frutas, ocorridas durante o armazenamento e a vida útil, *Penicillium expansum* também acarreta sérios danos à saúde humana e de animais, produzindo a micotoxina patulina (Prieta et al., 1994; Cheraghali et al., 2005). A maçã é uma das frutas mais susceptíveis à contaminação por patulina (Figura 3), por ser um excelente substrato para *Penicillium* spp. (Venturini et al., 2002).

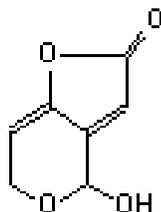


FIGURA 3 Estrutura química da patulina

A micotoxina patulina é produzida por várias espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*, mas é especialmente associada a *Penicillium expansum*, fungo parasita facultativo que invade frutas danificadas. A podridão produzida por ele apresenta manchas macias e aquosas e a parte deteriorada separa-se facilmente do tecido são. Seu efeito tóxico é caracterizado por distúrbios respiratório e motor, além de espasmos, asfixia, hemorragia no pulmão e cérebro. A patulina é considerada um perigo para a saúde do ser

humano, estando associada à formação de câncer no esôfago de pacientes que ingeriram suco de maçã e cidra contaminados (Scussel, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti) utilizados foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As folhas e limões destinados à obtenção de óleos essenciais foram obtidos no pomar da UFLA. Os frutos foram descascados e as cascas e folhas foram picadas em quadrados pequenos.

Os óleos essenciais foram extraídos pelo método de hidrodestilação, empregando o aparelho de Clevenger modificado, proposto por Craveiro et al. (1981). Utilizaram-se 500 gramas de folha e de casca para cada extração de cada variedade de limão. O material foi acondicionado em balões de 6 litros e mantido em ebulição, à temperatura constante, por 3 horas. Decorrido esse tempo, o hidrolato foi coletado e centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x G, por 5 minutos. A fase aquosa foi retirada do hidrolato adicionando-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica e levando-se à centrifugação novamente, para a obtenção do óleo puro. Os óleos essenciais foram armazenados, protegidos da luz, a 4°C.

3.2 Atividade dos óleos e microrganismos utilizados

As análises microbiológicas empregando-se óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

Para avaliação *in vitro* do efeito antimicrobiano dos óleos obtidos da casca e folha de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Candida utilis* CCT 3469 e *Penicillium expansum* CCT 4680.

3.3 Preparação do inóculo

Foram utilizadas culturas das bactérias mantidas em meio de congelamento (glicerol 125mL, extrato de levedura 1,5g, peptona bacteriológica 2,5g, NaCl 2,5g, 1 litro de água destilada) e da levedura em meio YW (extrato de levedura 3g, extrato de malte 3g, peptona bacteriológica 5g, glicose 10g, ágar 15g, 1 litro de água destilada), acrescidas de glicerol, ambas estocadas a 4°C e do fungo em meio batata dextrose ágar (BDA), estocado a 25°C.

As cepas de bactérias e levedura foram reativadas inoculando-se uma alçada em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI); as culturas de *S. aureus* e *E. coli* foram incubadas, por 24 horas, a 37°C e *P. aeruginosa* e *C. utilis*, a 28°C, pelo mesmo período. Aliquotas de 1,0 mL das culturas foram transferidas para microtubos e centrifugadas, a 735 x G, por 15 minutos (centrífuga modelo 5415 C). Após separação, 10 µL das células foram coletados do pellet formado e inoculados em 200 mL de caldo BHI. O crescimento de cada cepa foi acompanhado pela determinação da densidade óptica, a 620 nm, a cada 2 horas, da cultura e do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), empregando-se a técnica de plaqueamento em microgota. As

culturas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram plaqueadas em ágar para contagem padrão (PCA), *E. coli* em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e *C. utilis* em ágar YW. Com os resultados obtidos de absorvância e UFC/mL de cada microrganismo, foram elaboradas curvas padrões.

3.4 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias e leveduras

A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão em ágar por cavidade em placa, proposto por Deans & Ritchie (1987) e modificado por Mendonça (2004). Adicionou-se uma suspensão padronizada ($5,88 \times 10^8$ UFC/mL para *S. aureus*; $8,66 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli*; $3,31 \times 10^8$ UFC/mL para *P. aeruginosa*; 8×10^6 UFC/mL para *C. utilis*) dos microrganismos a 10 mL de ágar Müeller Hinton (bactérias) e ágar YEPG (em g/L: extrato de levedura 10; peptona bacteriológica 20; glicose 20; ágar 15)(levedura), à temperatura de 45°C, obtendo-se a concentração final de 10^8 UFC/mL para bactérias e 10^6 UFC/mL para levedura, homogeneizando-se a mistura que foi depositada imediatamente sobre uma camada (10 mL) do mesmo ágar já solidificado. Os slots foram feitos na superfície do agar, com auxílio de pérolas de vidro, retiradas previamente. Alíquotas de 8 µL de cada diluição dos óleos essenciais foram depositadas nos slots. Foram utilizadas as concentrações de 10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL de cada óleo, diluídas em etanol. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD, a 37°C (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e 28°C (*Pseudomonas aeruginosa* e *Candida utilis*), por 48 horas. Foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados e o etanol foi utilizado como controle. As análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre fungo

Foram avaliados os efeitos fungicidas dos óleos essenciais de *Citrus* nas concentrações de 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 µL/mL. Foram observados o crescimento e ou a inibição micelial da cultura fúngica, por meio de comparação com placa-padrão (sem óleo) (Stangarlin et al., 1999)

Foram adicionadas, em 10 mL de ágar BDA (batata dextrose ágar) esterilizado, as diferentes concentrações dos óleos essenciais, homogeneizando-se a mistura que foi depositada imediatamente sobre uma camada (10 mL) do mesmo ágar já solidificado.

O inóculo, constituído por um disco de micélio de 8 mm de diâmetro, contendo o fungo em estudo, foi transferido para o centro das placas. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas, em BOD, à temperatura de 25°C, durante 7 dias.

As avaliações foram realizadas após 7 dias, por meio de medições diametralmente opostas do crescimento micelial. As análises foram realizadas em triplicata.

3.6 Análise estatística

Para os microrganismos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida utilis* foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC), num esquema de análise fatorial (3 x 2 x 5), sendo três óleos (limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti), dois locais (casca e folha), cinco concentrações (10, 20, 40, 80 e 160 µL/mL) com três repetições e mais um tratamento adicional (testemunha), totalizando 108 observações.

Em se tratando do fungo *Penicillium expansum*, a análise estatística foi conduzida considerando-se a natureza dos resíduos como aproximadamente normal, ou seja, violando-se a pressuposição de normalidade que garante a exatidão dos testes. Isso pode alterar as taxas de erro tipo I (probabilidade de

rejeitar a hipótese nula, dado que ela é verdadeira e é representada por H_0) e as de erro tipo II (probabilidade de não rejeitar a hipótese nula, dado que ela é falsa e é representada por H_1) de forma negativa. Portanto, as conclusões tiradas para essa variável devem ser tiradas com ressalvas.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC) num esquema de análise fatorial (3 x 2 x 5), sendo três óleos (limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti), dois locais (casca e folha), cinco concentrações (0,25, 0,5, 1, 2 e 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) com três repetições e mais um tratamento adicional (testemunha), totalizando 93 observações.

Os programas estatísticos utilizados foram o SAS[®] v.8.2 (SAS Institute, 2000) e o Sisvar (Ferreira, 2000). Quanto à análise de variância, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey e pelo teste F, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Os halos de inibição produzidos pelos óleos essenciais de *Citrus limonia* Osbeck (limão-cravo), *Citrus aurantifolia* (Chrst.) Swingle (limão-galego) e *Citrus latifolia* Tanaka (limão-tahiti), da casca e da folha, em placas contendo as bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, foram medidos, revelando efeito inibitório dos óleos.

Na Figura 4 pode-se observar o bioensaio contendo os halos de inibição formados pela inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, causada pelos óleos essenciais da folha do limão-cravo e casca do limão-tahiti.

Os óleos essenciais estudados foram mais eficazes em inibir o crescimento de *S. aureus* (Tabela 1). As bactérias *Escherichia coli* (Tabela 2) e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 3) se mostraram mais resistentes à atividade antimicrobiana dos óleos. Resultados encontrados por Fisher & Phillips (2006) também mostram a maior eficiência dos óleos essenciais de *Citrus* sobre as bactérias gram-positivas do que sobre as bactérias gram-negativas nos testes *in vitro*. Resultados similares são encontrados para os mais diversos óleos essenciais e microrganismos (Smith-Palmer et al., 1998; Dorman & Deans, 2000; Burt, 2004).

Vários trabalhos demonstraram que, embora os óleos essenciais sejam efetivos em inibir tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, a presença da membrana externa nas bactérias gram-negativas as torna menos susceptíveis a algumas substâncias. Esse fato decorre do caráter hidrofílico da membrana celular externa dessas bactérias, que atua como barreira à

permeabilidade de várias substâncias ou devido ao tamanho de suas porinas, a qual varia entre os microrganismos (Smith-Palmer et al., 1998, Nikaido, 2003).

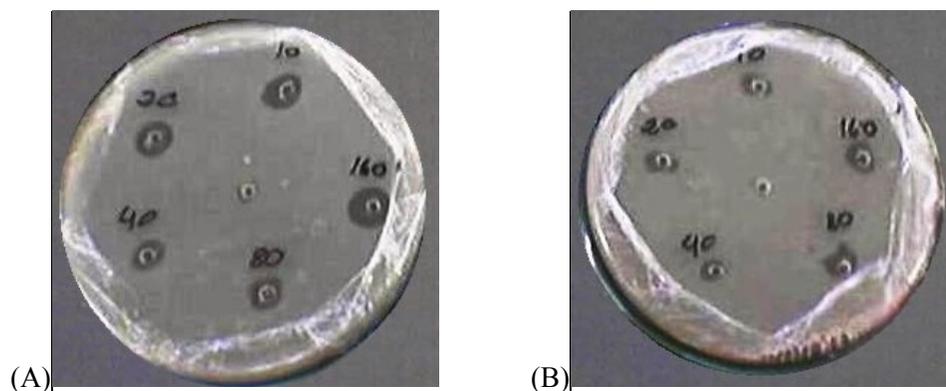


FIGURA 4 Halos formados pela inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* pelos óleos essenciais da folha do limão-cravo (A) e da casca do limão-tahiti (B).

TABELA 1 Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (casca e folha) sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*

Concentração (μL/mL)	Formação do halo de inibição (mm)					
	Galego folha	Galego casca	Cravo folha	Cravo casca	Tahiti folha	Tahiti casca
0	3,7	3,3	3,3	3,3	3,7	3,3
10	7,8	7,7	7,3	6,8	7	8,2
20	8,2	8,7	9	7,3	7,6	8,3
40	8	8,2	8,7	7,7	8,2	8,7
80	8,7	8,8	8,8	8,2	8,5	9
160	9	9,3	9,7	7,8	8,7	9,7

Zona de inibição em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a análise de variância se mostrou significativa para as concentrações e para a interação entre

o óleo e o local de extração (casca e folha) ($P \leq 0,05$). Pelos dados descritos na Tabela 1, observa-se que, ao considerar os óleos obtidos da casca de limão-galego e do limão-tahiti, estes demonstraram maior inibição do crescimento bacteriano que o óleo de limão-cravo; porém, já os óleos obtidos da folha não apresentaram significativa variação na indução de formação do halo para nenhum dos óleos, mas promoveram uma boa formação de halo da bactéria.

Na Tabela 1 observa-se que, para o limão-cravo, o óleo obtido da folha promoveu maior halo de inibição que o da casca; para o óleo de limão-galego, tanto o da casca quanto o da folha não tiveram diferença estatística entre eles; já para o óleo de limão-tahiti, o óleo da casca promoveu maior inibição da bactéria que o óleo da folha ($P < 0,05$).

Chang et al. (2001) verificaram a atividade antibacteriana do óleo da folha de *Cinnamomum osmophloeum* e seus constituintes sobre nove espécies de bactérias e observaram concentração inibitória mínima (MIC) para folha de 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ sobre *K. pneumoniae* e *Salmonella* sp., e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre as outras sete espécies de bactérias. Quando utilizou-se apenas o padrão de cinamaldeído, os MICs sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, MRSA, *K. pneumoniae*, *Salmonella* sp. e *V. parahemolyticus* foram de 500, 1.000, 250, 250, 250, 250, 1.000, 500 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

A progressão da formação do halo de inibição da bactéria *Staphylococcus aureus* submetida a diferentes concentrações é mostrada na Figura 5. Nota-se que houve um aumento da formação de halo da bactéria com o aumento da concentração dos óleos ($P < 0,05$). Em contraste, a concentração de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ promoveu maior inibição da bactéria que a concentração de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

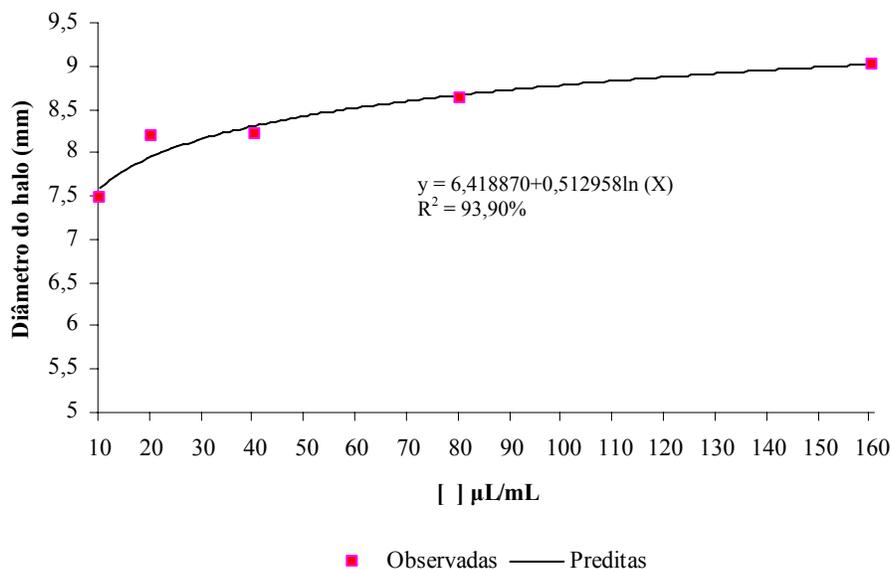


FIGURA 5 Halos de inibição sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*, em função das concentrações dos óleos essenciais de citros.

Na Figura 6 observam-se os halos de inibição formados pelos óleos essenciais da folha do limão-cravo e casca do limão-galego sobre *Escherichia coli*.

Pelos dados da Tabela 2, observa-se que, quando comparados os óleos obtidos da casca, o óleo da casca do limão-galego apresentou maior halo de inibição que os óleos da casca do limão-tahiti e do limão-cravo. Já para a folha, todos os óleos testados não apresentaram variação significativa, porém, todos promoveram formação do halo, segundo a análise de variância que se mostrou significativa para as interações entre o óleo e o local, e o óleo e a concentração ($P \leq 0,05$).

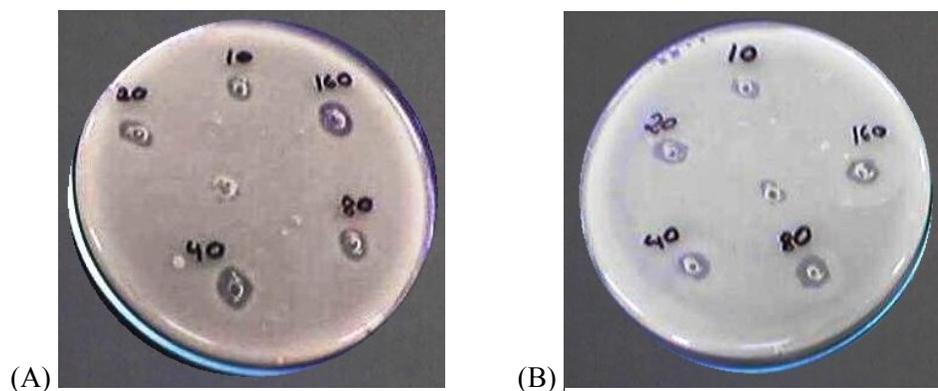


FIGURA 6 Halos formados pela inibição do crescimento de *Escherichia coli*, pelos óleos essenciais da folha do limão-cravo (A) e da casca do limão-galego (B).

Duarte et al. (2007) verificaram a atividade de óleos essenciais de folhas de 29 plantas medicinais normalmente usadas no Brasil sobre *Escherichia coli* e observaram que o óleo de *Cymbopogon martinii* exibiu um amplo espectro de inibição e apresentou forte atividade (MIC entre 100 e 500 μg/mL) sobre 10 dos 13 tipos de *Escherichia coli*, sendo três enterotoxigênicas, duas enteropatogênicas, três enteroinvasivas e duas produtoras de shiga toxina (STEC).

TABELA 2 Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (casca e folha) sobre a bactéria *Escherichia coli*

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Formação do halo de inibição (mm)					
	Galego folha	Galego casca	Cravo folha	Cravo casca	Tahiti folha	Tahiti casca
0	3,3	3,7	3,7	3,3	3,3	3,3
10	6,2	6,8	6,3	5,7	6,2	6
20	6,3	7,8	6,8	5,8	6,3	7
40	6,7	7,3	7,8	6,3	6,7	6,5
80	7	7,8	7,3	7	7	6,7
160	7,5	8,2	8,5	7,5	7,2	6,3

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

Pelos dados da Tabela 2, pode-se observar que os efeitos dos óleos essenciais obtidos das folhas para o limão-cravo e o tahiti, foram maiores que os obtidos da casca. Para o limão-galego, a casca apresentou melhor resultado que a folha. Já em relação às concentrações, os óleos essenciais de limão-cravo, tahiti e galego não apresentaram significativa variação na indução de formação de halo, nas concentrações de 10, 20, 40 e 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Para a concentração de 160 $\mu\text{L}/\text{mL}$, os óleos essenciais de limão-tahiti e galego apresentaram melhores resultados de inibição do crescimento de *Escherichia coli* que o óleo do limão-cravo.

A progressão da formação do halo de inibição da bactéria *Escherichia coli* submetida aos diferentes óleos e concentrações é mostrada nas Figuras 7, 8 e 9. Na Figura 7, pode-se observar que o melhor resultado de inibição para o óleo de limão-cravo foi encontrado na concentração de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

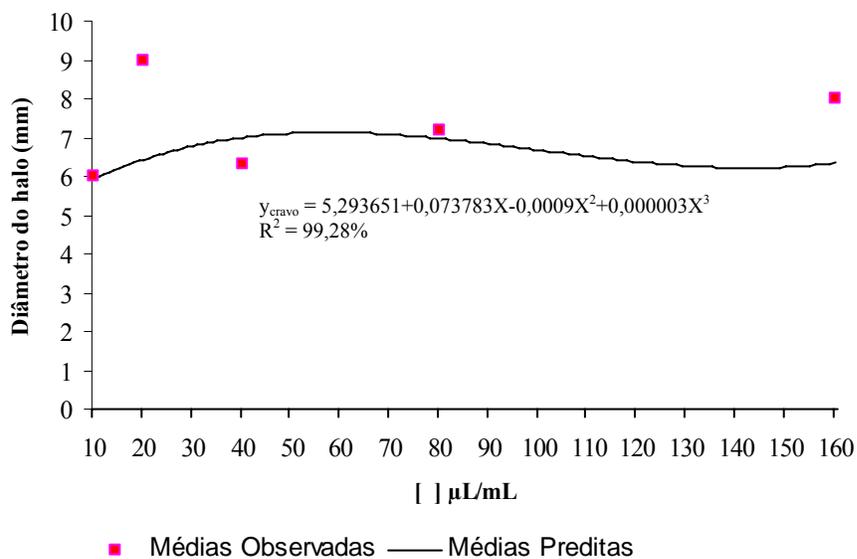


FIGURA 7 Halos de inibição sobre a bactéria *Escherichia coli*, em função das concentrações para o óleo essencial de limão-cravo (folha + casca).

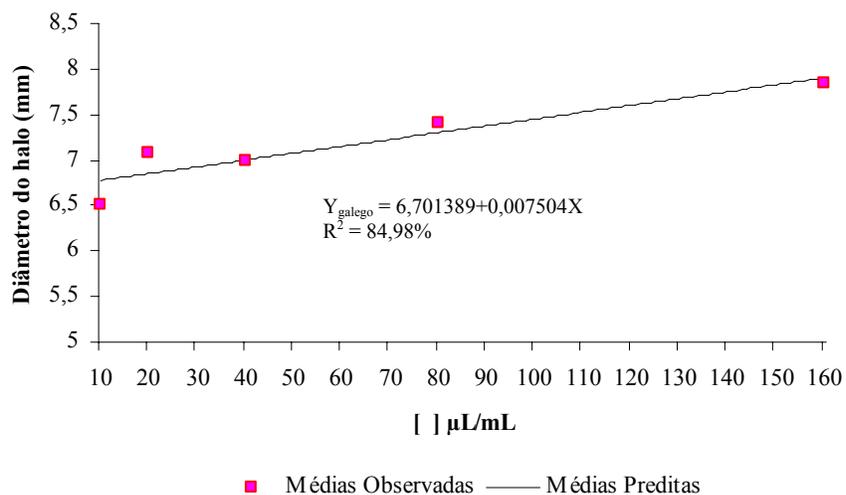


FIGURA 8 Halos de inibição sobre a bactéria *Escherichia coli*, em função das concentrações para o óleo essencial de limão-galego (folha + casca).

Pela Figura 8, observa-se que houve aumento da formação de halo da bactéria com o aumento da concentração dos óleos de limão-galego ($P < 0,05$). Em contraste, a concentração de 20 $\mu\text{L/mL}$ promoveu maior inibição da bactéria do que a concentração de 40 $\mu\text{L/mL}$. Pela Figura 9, pode-se observar que o melhor resultado de inibição para o óleo de limão-tahiti foi encontrado na concentração de 80 $\mu\text{L/mL}$.

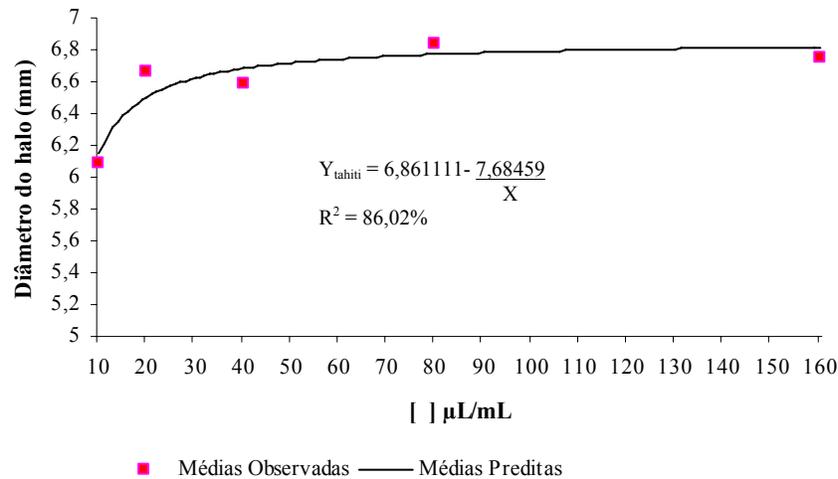


FIGURA 9 Halos de inibição sobre a bactéria *Escherichia coli*, em função das concentrações para o óleo essencial de limão-tahiti (folha + casca).

A constância nos resultados observados entre os microrganismos testados provavelmente ocorre devido ao etanol utilizado na diluição dos óleos. Esse solvente pode alterar a entrada do óleo na célula bacteriana, facilitando sua difusão em maiores diluições, porém, pouco se conhece a respeito da ação do óleo sobre a estrutura bacteriana (Cox et al., 2000).

Pela Figura 10 pode-se observar o bioensaio dos halos de inibição formados pelos óleos essenciais da casca e da folha do limão-galego sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Com base nos resultados obtidos neste experimento, a análise de variância se mostrou significativa para os óleos, locais e concentrações e não foi significativa para nenhuma das interações ($P \leq 0,05$).

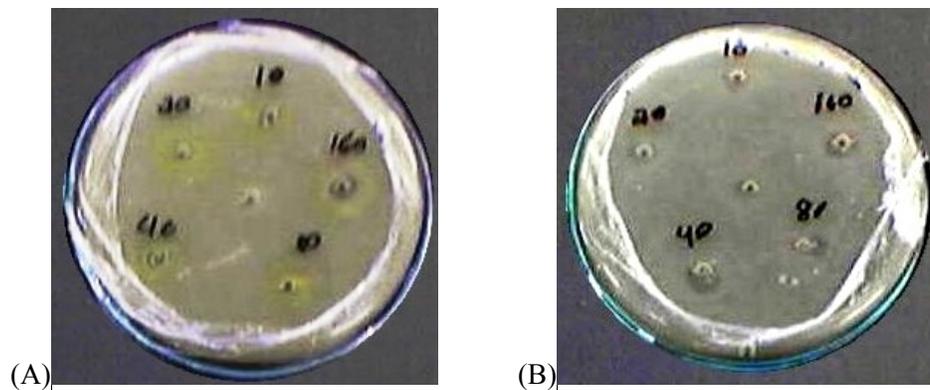


FIGURA 10 Halos formados pela inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, pelos óleos essenciais da casca (A) e da folha do limão-galego (B).

Nakamura et al. (1999) estudaram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. e verificaram que o mesmo inibiu *Staphylococcus aureus* a uma concentração de 0,75 $\mu\text{g/mL}$. A concentração inibitória mínima (MIC) para *Shigella flexineri*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Proteus mirabilis* estavam em concentrações que variam de 3 a 12 $\mu\text{g/mL}$. O ponto final não foi alcançado para *Pseudomonas aeruginosa* (≥ 24 mg/mL).

TABELA 3 Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (casca e folha) sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

Concentração (µl/ml)	Formação do halo de inibição (mm)					
	Galego folha	Galego casca	Cravo folha	Cravo casca	Tahiti folha	Tahiti casca
0	3,3	3,7	3,3	3	3,7	3,7
10	5,3	5,3	4,7	3,7	5	4,3
20	5,7	5,7	5	4,3	6,2	5
40	6	6	5,3	4,7	6	5,3
80	6,3	6	5,7	5	5,5	5,7
160	7	7,3	6	5,3	5,3	6,2

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm.

De acordo com os dados da Tabela 3, observa-se que o óleo essencial de limão-galego apresentou maior inibição sobre *Pseudomonas aeruginosa* do que os demais óleos testados. Comparando-se a atuação inibitória dos óleos da folha e da casca, observa-se que os óleos essenciais obtidos da folha dos citros apresentaram maior inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, quando comparados com os óleos obtidos da casca.

A progressão da formação do halo de inibição da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* submetida a diferentes concentrações é mostrada na Figura 11. Houve aumento da formação de halo da bactéria com o aumento da concentração dos óleos ($P < 0,05$).

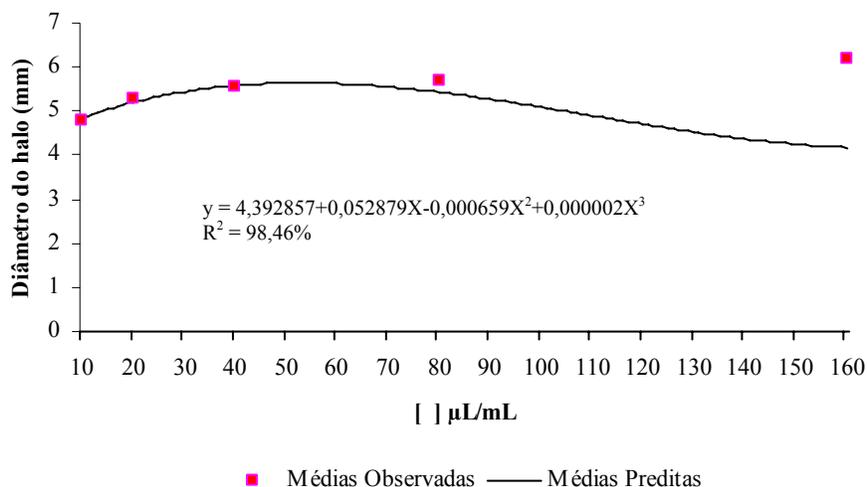


FIGURA 11 Halos de inibição sobre a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, em função das concentrações dos óleos essenciais de citros.

Trabalhos que descrevem a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de citros são escassos, dificultando a comparação entre resultados. Contudo, vários fatores influenciam os resultados obtidos. Dentre eles, podem-se citar a época de colheita da planta, a localização geográfica e o método de extração do óleo essencial. Outro fator que pode influenciar drasticamente nos resultados obtidos é a metodologia empregada para avaliação. Normalmente, os resultados diferem nessa metodologia, sendo, assim, difícil a comparação entre os resultados (Dorman & Deans, 2000; Burt, 2004).

4.2 Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Candida utilis*

Os óleos essenciais limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti, casca e folha apresentaram níveis significativos de inibição sobre o microrganismo testado.

Na Figura 12 pode-se observar o bioensaio dos halos de inibição formados pelos óleos essenciais da folha do limão-galego e folha do limão-tahiti sobre *Candida utilis*.

Os resultados mostram que os óleos essenciais de citros apresentam um efeito inibitório significativo sobre a levedura estudada, que é mostrado pelos grandes halos de inibição formados (Tabela 4).

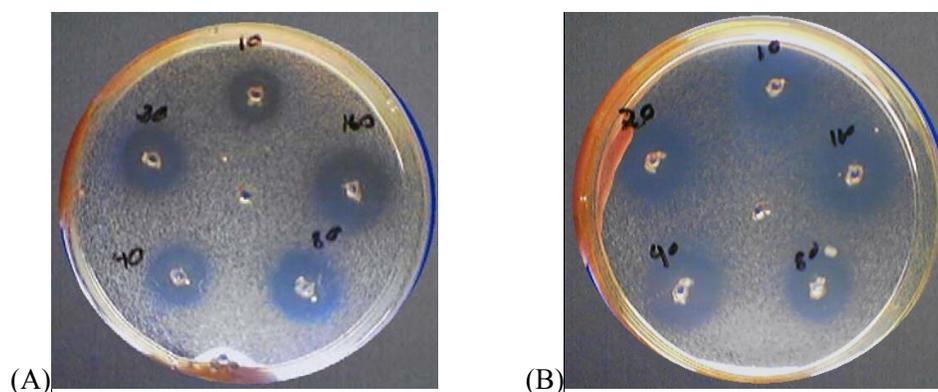


FIGURA 12 Halos formados pela inibição do crescimento de *Candida utilis*, pelos óleos essenciais da folha do limão-galego (A) e da folha do limão-tahiti (B).

TABELA 4 Resultados médios do efeito inibitório dos óleos essenciais de citros (folha e casca) sobre a levedura *Candida utilis*

Concentração ($\mu\text{L/mL}$)	Formação do halo de inibição (mm)					
	Galego folha	Galego casca	Cravo folha	Cravo casca	Tahiti folha	Tahiti casca
0	3	3	3	3	3	3
10	13,3	11	9,7	7,7	8,7	7,7
20	15,7	12,7	11	9	11,7	9,7
40	16,3	14,7	12,3	11	15	12
80	18	16	13	12,3	15,7	13,7
160	20	17,3	14,3	13,7	17,7	15,7

Zona de inibição, em mm, incluindo o diâmetro do slot. Diâmetro do slot, 3 mm

Com base nos resultados obtidos neste experimento, constata-se que houve interação significativa entre os óleos, locais e concentrações ($P < 0,05$). O óleo de limão-galego, tanto da casca quanto da folha, apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento entre os óleos em todas as concentrações testadas. Porém, o óleo essencial da folha do limão-galego apresentou melhor inibição do crescimento da levedura estudada do que o óleo da casca.

Comparando-se a ação inibitória do óleo essencial de limão-cravo, observa-se que o óleo da folha promoveu melhor inibição do crescimento de *Candida utilis* nas concentrações mais baixas (10, 20 e 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$) que o óleo da casca do limão-cravo. Já para as concentrações mais altas (80 e 160 $\mu\text{L}/\text{mL}$), os óleos da casca e da folha do limão-cravo não diferiram estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

O óleo essencial da folha do limão-tahiti apresentou os melhores resultados de inibição do crescimento, para todas as concentrações, quando comparado com o óleo da casca de limão-tahiti.

A progressão da formação do halo de inibição da levedura *Candida utilis* submetida aos diferentes óleos e locais é mostrada nas Figuras 13, 14 e 15. Na Figura 13 pode-se observar que houve um aumento da formação de halo da levedura com o aumento da concentração dos óleos, tanto para o óleo da casca quanto para o óleo da folha do limão-cravo ($P < 0,05$).

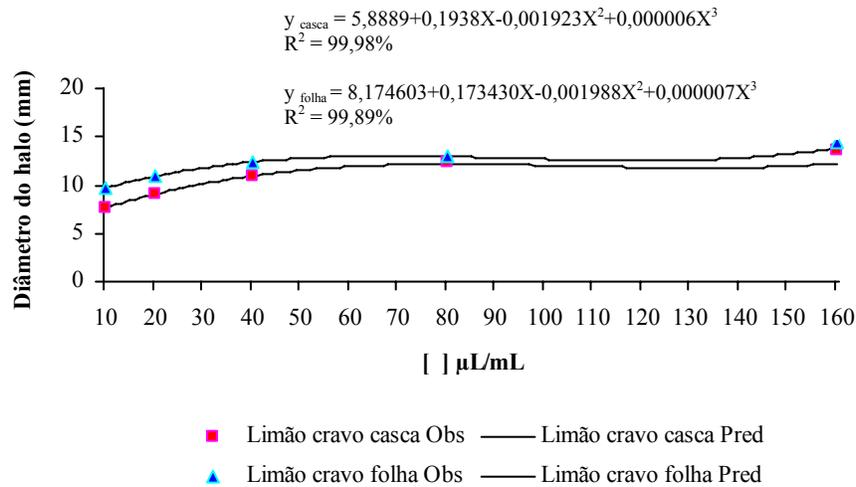


FIGURA 13 Halos de inibição sobre a levedura *Candida utilis*, em função das concentrações dos óleos essenciais da casca e da folha de limão-cravo.

Pela Figura 14, pode-se observar que, para o óleo da casca do limão-galego, houve aumento da formação de halo da levedura com o aumento da concentração. Para o óleo da folha do limão houve um aumento da formação de halo da levedura com o aumento da concentração ($P < 0,05$). Em contraste, a concentração de 20 $\mu\text{L/mL}$ promoveu maior inibição da bactéria que a concentração de 40 $\mu\text{L/mL}$.

Na Figura 15, pode-se verificar que, para o óleo do limão-tahiti, houve aumento da formação de halo da levedura com o aumento da concentração, tanto para o óleo da casca quanto para o óleo da folha do limão-tahiti.

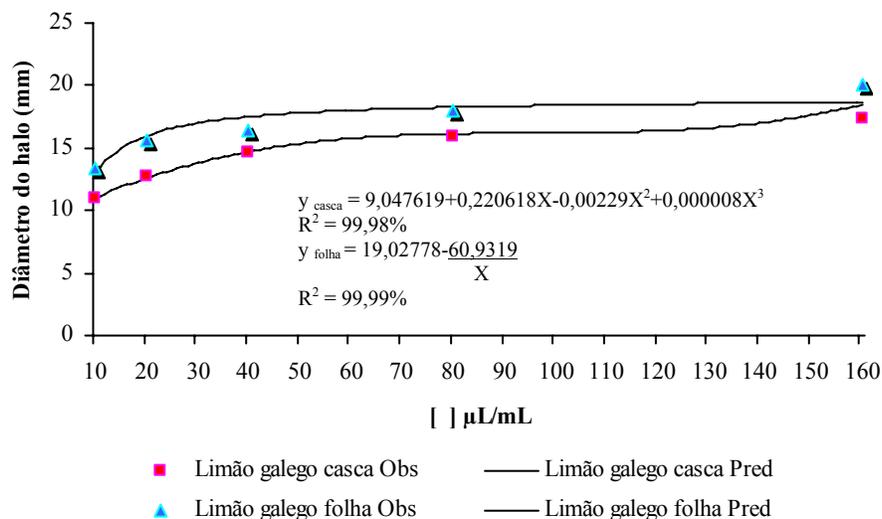


FIGURA 14 Halos de inibição sobre a levedura *Candida utilis*, em função das concentrações dos óleos essenciais da casca e da folha de limão-galego.

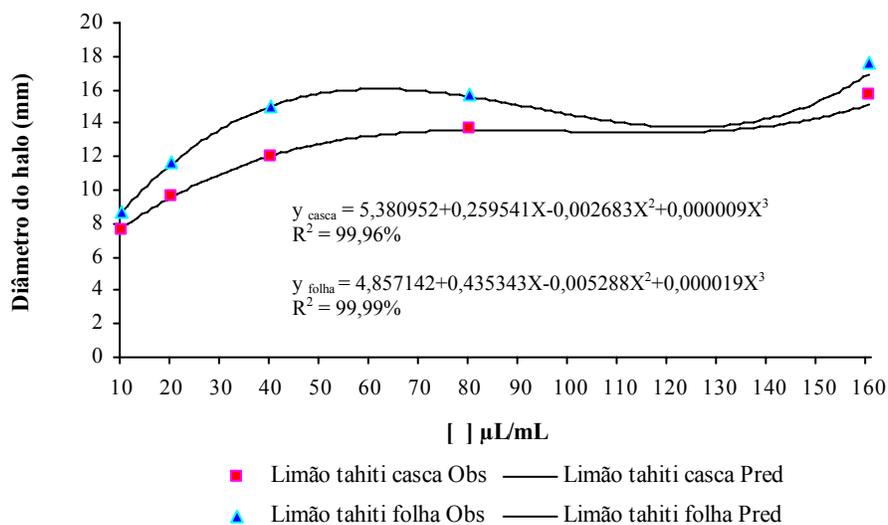


FIGURA 15 Halos de inibição sobre a levedura *Candida utilis*, em função das concentrações dos óleos essenciais da casca e da folha de limão-tahiti.

Sacchetti et al. (2005) verificaram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* promoveu notável inibição no crescimento das leveduras *Candida albicans* ATCC 48274, *Rhodotorula glutinis* ATCC 16740, *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 60232, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2365 e *Yarrowia lypolítica* ATCC 16617.

Souza et al. (2007) trabalharam com o óleo de orégano (*Origanum vulgare* L.) e obtiveram um efeito inibitório substancial sobre todas as leveduras estudadas, mostrando um grande halo de inibição do crescimento das leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Pichia minúscula* e *Rhodotorula rubra*, com valores de MIC, para a maioria delas, de 20 e 0,6 µL/mL.

4.3 Efeito inibitório dos óleos essenciais de citros sobre *Penicillium expansum*

As propriedades fungicidas dos óleos de limão-cravo, limão-galego e limão-tahiti foram testadas sobre o crescimento e ou a inibição micelial de *Penicillium expansum*.

Pela Figura 16 pode-se observar a inibição total com o óleo essencial da folha do limão-galego sobre *Penicillium expansum*, bem como o bioensaio do óleo essencial da casca de limão-cravo, o qual estimulou o desenvolvimento fúngico do microrganismo em questão.

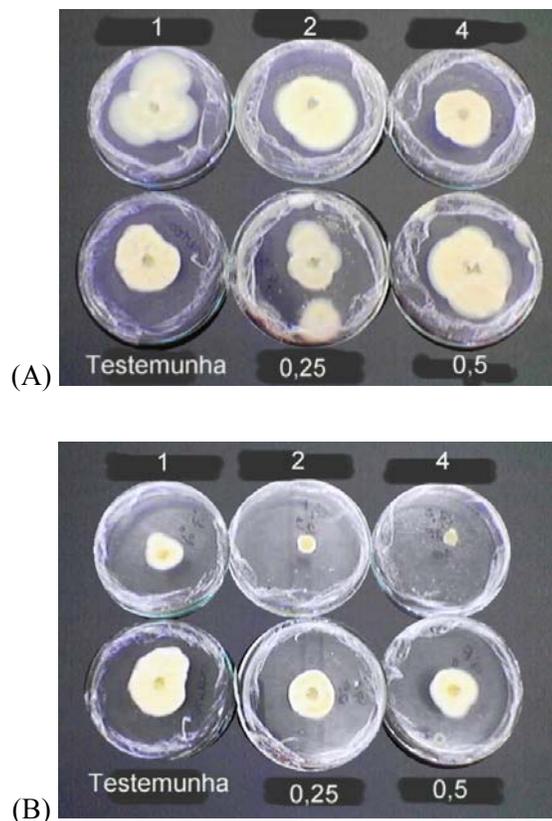


FIGURA 16 Crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, pelo óleo essencial da casca do limão-cravo (A) e inibição micelial do fungo pelo óleo essencial da folha do limão-galego (B).

Com base nos resultados obtidos neste experimento, constata-se que houve interação significativa entre óleos, locais e concentrações ($P < 0,05$). Pelos dados descritos na Tabela 5, pode-se observar que o óleo da casca do limão-cravo promoveu o desenvolvimento micelial do fungo estudado. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2006) que relataram que esse tipo de comportamento requer um estudo específico, por se tratar de vários fatores, tais como: tipo de substrato, reação do fungo ao substrato e diferentes tipos de compostos que podem interferir sobre o comportamento do fungo.

TABELA 5 Resultados médios do crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum* pelos óleos essenciais de citros.

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Crescimento micelial (mm)					
	Galego folha	Galego casca	Cravo folha	Cravo casca	Tahiti folha	Tahiti casca
0	48	48	48	48	48	48
0,25	30	38	33	38	32	43
0,5	27	35	27	47	32	42
1	22	28	20	52	23	37
2	15	20	10	50	17	32
4	8	9	8	45	9	15

Crescimento micelial, em mm, incluindo o diâmetro do inóculo. Diâmetro do inóculo, 8 mm

Comparando-se a atuação inibitória dos óleos obtidos da casca dos limões, observa-se que o óleo da casca do limão-galego apresentou maior inibição do crescimento micelial do fungo, em todas as concentrações em relação aos demais óleos obtidos da casca. Apenas na concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo da casca do limão-cravo obteve resultado estatístico igual ao limão-galego ($P < 0,05$).

Pela Tabela 5 pode-se observar que, quando comparados os óleos obtidos da folha dos limões, na concentração de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo da folha de limão-galego apresentou maior inibição do crescimento micelial que os demais óleos. Na concentração de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, tanto o óleo da folha de limão-galego quanto o de limão-cravo apresentaram maior inibição do crescimento micelial que o óleo da folha do limão-tahiti. Nas concentrações de 1 e 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o óleo da folha do limão-cravo foi mais efetivo que os demais e, para a concentração de 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$, os óleos não diferiram estatisticamente entre si, porém, promoveram inibição total do crescimento micelial do fungo estudado.

O efeito inibitório dos óleos obtidos da folha foi maior que o efeito dos óleos obtidos pela casca, em todas as concentrações testadas, para todos os óleos ($P < 0,05$).

A progressão da inibição do crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum* submetido aos diferentes óleos e locais é mostrada nas Figuras 17, 18 e 19. Na Figura 13, pode-se observar que, em relação ao óleo da casca do limão-cravo, a concentração de 1 µL/ mL promoveu maior crescimento micelial do fungo. Para o óleo da folha do limão-cravo, houve progressiva inibição do crescimento micelial com o aumento das concentrações.

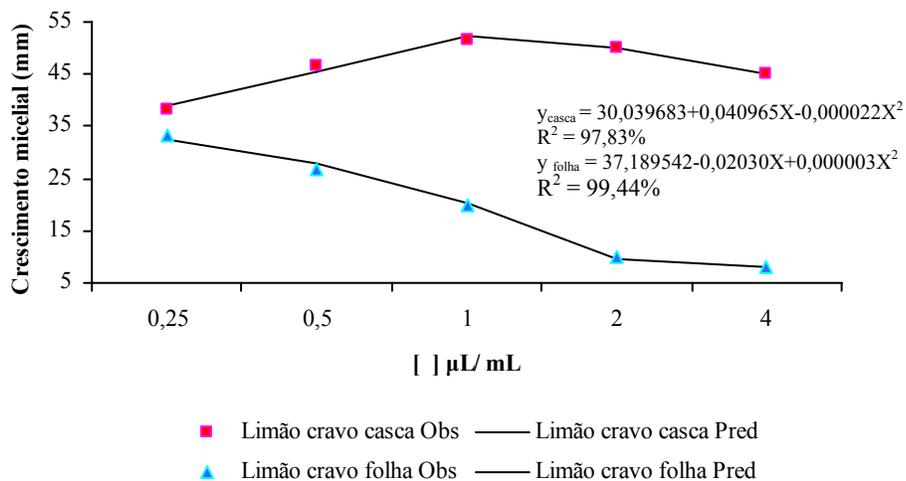


FIGURA 17 Crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das concentrações para o óleo essencial de limão-cravo (casca e folha).

Pela Figura 18, pode-se verificar que, tanto para o óleo da casca quanto para o óleo da folha do limão-cravo, houve progressiva inibição do crescimento micelial com o aumento das concentrações. O mesmo foi verificado com os óleos da casca e da folha de limão-tahiti (Figura 19).

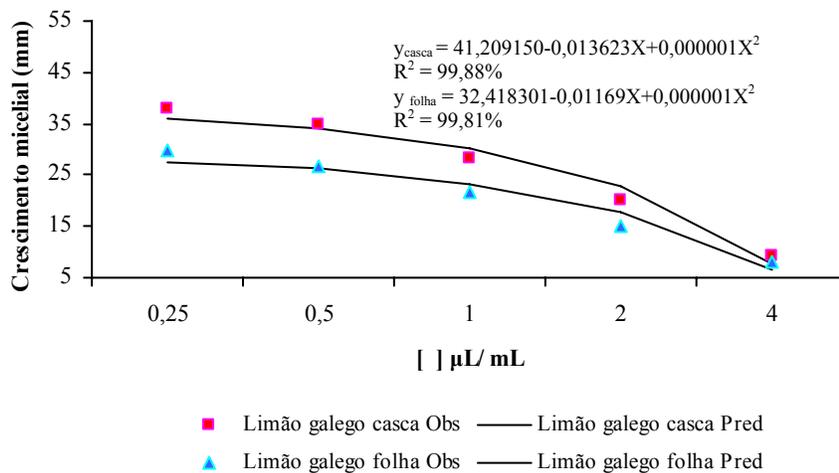


FIGURA 18 Crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das concentrações para o óleo essencial de limão-galego (casca e folha).

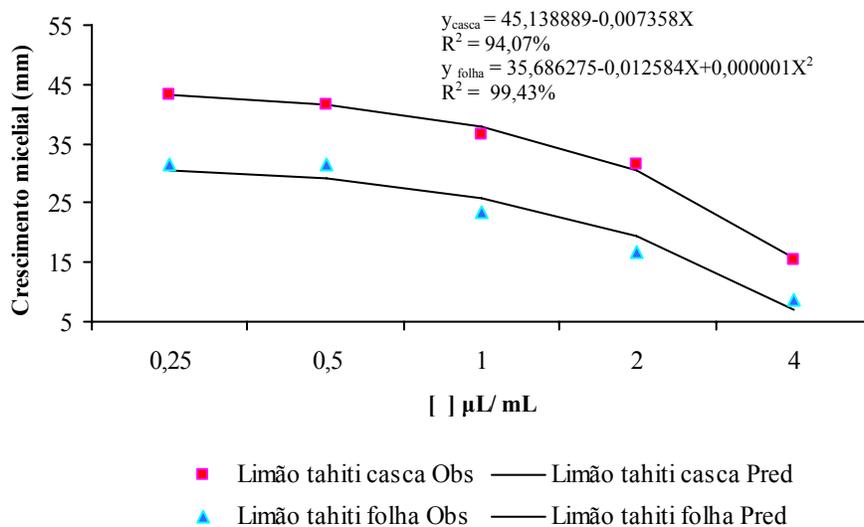


FIGURA 19 Crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das concentrações para o óleo essencial de limão-tahiti (casca e folha).

Caccioni et al. (1998) trabalharam com os componentes de óleos essenciais de frutos cítricos sobre *Penicillium italicum* e *Penicillium digitatum* e observaram que o citral é o componente mais ativo sobre *Penicillium digitatum*. Quando foi utilizado o óleo essencial de limão-siciliano, colhido em três épocas distintas, verificaram que o óleo do limão colhido em dezembro promoveu maior inibição dos fungos que os óleos dos limões colhidos em fevereiro e junho.

Sharma & Tripathi (2006) verificaram que o óleo essencial da casca de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck sobre *Aspergillus niger* promoveu a inibição total do crescimento micelial do fungo, na concentração de 3 µL/mL, após 7 dias de incubação.

5 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais testados apresentaram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus*, tendo o óleo essencial da casca do limão-tahiti promovido melhor inibição da bactéria em estudo.

Os óleos essenciais testados apresentaram efeito inibitório sobre *Escherichia coli*, tendo que o óleo essencial da casca do limão-galego promovido melhor inibição da bactéria em estudo.

Os óleos essenciais testados apresentaram efeito inibitório sobre *Pseudomonas aeruginosa*, tendo o óleo essencial da folha do limão-galego promovido melhor inibição da bactéria em estudo.

Os óleos essenciais testados apresentaram efeito inibitório sobre *Candida utilis*, tendo o óleo essencial da folha do limão-galego promovido melhor inibição da levedura em estudo.

Os efeitos inibitórios dos óleos essenciais foram efetivos sobre o fungo *Penicillium expansum*, porém, os óleos essenciais das folhas dos limões cravo e galego promoveram melhor inibição micelial do fungo em estudo.

Os efeitos inibitórios dos óleos essenciais foram efetivos sobre o fungo *Penicillium expansum*, porém, o óleo essencial da casca do limão-cravo estimulou o desenvolvimento micelial do fungo em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSINA, A.; MASON, M.; UPHOFF, R. A.; RIGGSBY, W. S.; BECKER, J. M.; MURPHY, D. Catheter-associated *Candida utilis* fungemia in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: species verification with a molecular probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 621-624, 1988.

BENVENUTI, F.; GIRONI, F.; LAMBERTI, L. Supercritical deterpenation of lemon essential oil, experimental data and simulation of the semicontinuous extraction process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, p. 29-44, 2001.

BOUGNOUX, M. E.; GUEHO, E.; POTOCKA, A. C. Resolutive *Candida utilis* Fungemia in a Nonneutropenic Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1644-1645, 1993.

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.

CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of *citrus* essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 73–79, 1998.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 3, p. 261-268, June 2001.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CÁSSIO, F.; LEÃO, C. Low- and high-affinity transport systems for citric acid in the yeast *Candida utilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 3623-3628, 1991.

CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 123-127, 2001.

- CHERAGHALI, A. M.; MOHAMMADI, H. R.; AMIRAHMADI, M.; YAZDANPANA, H.; ABOUHOSSAIN, G.; ZAMANIAN, F.; KHANSARI, M. G.; AFSHAR, M. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. **Food Control**, v. 16, p. 165–167, 2005.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 599-607, 2003.
- COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 130-135, 1999.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Meleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n.1, p. 170-175, Jan. 2000.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981.
- DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.
- DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELENA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p.197–201, 2007.
- FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 35-40, 2002.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para o Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO RASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FISHER, K.; PHILIPS, C. A. The Effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1232-1240, 2006.

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; MARTIN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetics findings. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 187 -194, 2005.

GRASSI FILHO, H. PENTEADO, B. B.; SANTOS dos, C. H. Preparo de amostras e métodos para a determinação do teor de óleo essencial de frutos de limoeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 191-193, 2005.

ISLAM, M.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Survival of *Escherichia coli* 0157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields trated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 63-70, Jan. 2005.

JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, p. 179-183, 1999.

KARPOUHTSIS, I.; PARDALI, E.; FEGGOU, E.; KOKKINI, S.; SCOURAS, Z.G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1111-1115, 1998.

KIM, S. H.; WEI, C. A ntibiotic resistance and Caco-2 cell invasion of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from farm environments and retail products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 356–363, 2007.

KONDO, K.; SAITO, T.; KAJIWARA, S.; TAKAGI, M.; MISAWA, N. A transformation system for the yeast *Candida utilis*: use of a modified endogenous ribosomal protein gene as a drug-resistant marker and ribosomal

DNA as an integration target for vector DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 7171–7177, 1995.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453–462, 2001.

LEGNANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 153–158, 1999.

LIRA, W. M.; MACEDO, C.; MARINI, J. M. The Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle with mastitis in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 861-866, Oct. 2004.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 366–373, 2002.

MARI, M.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G. C. Non-conventional methods for the control of post-harvest pear diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 761-766, 2003.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; THOMSON-CARTER, F. M.; GARVEY, P.; McGUIRE, L.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. The prevalence and spread of *Escherichia coli* 0157:H7 at a commercial beef abattoir. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 256-266, Aug. 2003.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72p. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOUFIDA, S.; MARZOUK, B. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1283–1289, 2003.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, v. 13, p. 289-292, 2002.

NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; D. FILHO, B. P. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-678, Sept./Oct. 1999.

NATARO, P. J.; KAPER, B. J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593–556, Dec. 2003.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. A.; SOARES, A. F.; FONSECA, E. V. N.; PICCOLI, R. H. Inhibition fungi growth through of utilization essential oils of spice. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 731-738, jul./ago. 2006.

PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 59–63, 2002.

PINTO, E.; SALGUEIRO, L.R.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; GONÇALVES, A. M. J. *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 1-7, 2007.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 569–575, 2003.

- PRIETA, J.; MORENO, M. A.; DIAZ, S.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. Survey of patulin in apple juice and children's apple food by the biphasic dialysis membrane procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p.1701–1703, 1994.
- RESTUCCIA, C.; RANDAZZO, C.; CAGGIA, C. Influence of packaging on spoilage yeast population in minimally processed orange slices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p.146–150, 2006.
- RUSSO, M.; GALLETTI, G. C.; BOCCHINI, P.; CARNACINI, A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3741-3746, 1998.
- SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.
- SANTOS, A. L. **Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- SAS INSTITUTE. **SAS for Windows, Release 8**. Cary, NC, 2000.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.
- SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1327-1332, 1996.
- SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, p. 1-8, Jun, 2006.
- SIKKEMA, J.; De BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 11, p. 8022–8028, 1994.

SIKKEMA, J.; De BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p. 261-263, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, RS: UFSC, 2004. 1102p.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

SMITS, J. G.; BRUL, S. Stress tolerance in fungi — to kill a spoilage yeast. **Food biotechnology**, v. 16, p. 225-230, 2005.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, p. 409–413, 2007.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, Brasília, n. 11, p. 16-21, 1999.

SVOBODA, K. P. Lemon scented plants. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, p.23–32, 2003.

SZITA, G.; TABAJDI, V.; FÁBIÁN, A.; BIRÓ, G.; REICHART, O.; KORMOCZY, P. S. A novel, selective synthetic acetamide containing culture medium for isolating *Pseudomonas aeruginosa* from milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 123–127, 1998.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

ULTEE, A.; SMID, E. J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 373–378, 2001.

VAN HOUDT, R.; AERTSEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A. L.; MICHIELS, C.W. Biofilm formation and cell-to-cell signaling in gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 177–184, 2004.

VENTURINI, M. E.; ORIA, R., BLANCO, D. Microflora of two varieties of sweet cherries: burlat and sweetheart. **Food Microbiology**, v. 19, p. 15-21, 2002.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oil with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, Oct./Dec. 1998.

ANEXOS

TABELA 1A	Análise de variância para os óleos, local (casca e folha) e concentrações para os microrganismos <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em um Delineamento Inteiramente Casualizado.....	53
TABELA 2A	Análise de variância para os óleos, local (casca e folha) e concentrações para os microrganismos <i>Candida utilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> em um Delineamento Inteiramente Casualizado.....	54
TABELA 3A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Penicillium expansum</i> em função do tratamento adicional (testemunha).....	54
TABELA 4A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre <i>Staphylococcus aureus</i> em função do local (casca e folha) (DMS: 0,8596).....	55
TABELA 5A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros, casca e folha sobre <i>Staphylococcus aureus</i> em função das variedades de limão.....	55
TABELA 6A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre <i>Escherichia coli</i> em função do local (casca e folha) (DMS: 0,8596).....	55
TABELA 7A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros, casca e folha sobre <i>Escherichia coli</i> em função das variedades de limão.	56
TABELA 8A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre <i>Escherichia coli</i> em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).	56

TABELA 9A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função das variedades de limão (DMS: 0,8596).....	56
TABELA 10A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros, casca e folha sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
TABELA 11A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais obtidos das cascas de citros sobre <i>Candida utilis</i> em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).....	57
TABELA 12A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais obtidos das folhas de citros sobre <i>Candida utilis</i> em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).....	57
TABELA 13A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de limão-cravo (casca e folha) sobre <i>Candida utilis</i> em função das diferentes concentrações.....	58
TABELA 14A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de limão-galego (casca e folha) sobre <i>Candida utilis</i> em função das diferentes concentrações.....	58
TABELA 15A	Valores médios do diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de limão-tahiti (casca e folha) sobre <i>Candida utilis</i> em função das diferentes concentrações.....	58
TABELA 16A	Análise de variância para os óleos, local (casca e folha) e concentrações para o fungo <i>Penicillium expansum</i> em um Delineamento Inteiramente Casualizado.....	59

TABELA 17A	Valores médios da avaliação dos óleos essenciais de citros, obtidos das cascas sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).	59
TABELA 18A	Valores médios da avaliação dos óleos essenciais de citros, obtidos das folhas sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).	60
TABELA 19A	Valores médios da avaliação do óleo essencial de limão-cravo (casca e folha) sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das diferentes concentrações.....	60
TABELA 20A	Valores médios da avaliação do óleo essencial de limão-galego (casca e folha) sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das diferentes concentrações.....	61
TABELA 21A	Valores médios da avaliação do óleo essencial de limão-tahiti (casca e folha) sobre o crescimento micelial do fungo <i>Penicillium expansum</i> em função das diferentes concentrações.....	61

TABELA 1A Análise de variância para os óleos, local (casca e folha) e concentrações, para os microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, em um delineamento inteiramente casualizado.

Fonte de variação	Gl	Quadrados médios (p-valor)			
		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Óleo (O)	2	2,5694	(<0,0001)	10,0028	(<0,001)
Local (L)	1	0,1000	(0,4773)	3,2111	(0,0008)
Concentração (C)	4	4,4583	(<0,001)	4,6917	(<0,001)
O x L	2	5,9083	(<0,001)	0,7861	(0,0556)
O x C	8	0,6042	(0,0043)	0,4646	(0,0959)
C x L	4	0,4472	(0,066)	0,5444	(0,0915)
O x L x C	8	0,2347	(0,3047)	0,2965	(0,3530)
Fatorial x adicional	1	177,9630	(<0,0001)	60,6685	(<0,0001)
Erro	77	0,1940837		0,2619048	
CV (%)		6,9764		9,8874	

(P<0,05).

TABELA 2A Análise de variância para óleos, local (casca e folha) e concentrações para os microrganismos *Candida utilis* e *Staphylococcus aureus*, em um delineamento inteiramente casualizado.

Fonte de variação	Gl	Quadrados médios (p-valor)			
		<i>Candida utilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
Óleo (O)	2	131,2111	(<0,001)	0,8694	(0,0165)
Local (L)	1	80,2778	(<0,001)	0,0444	(0,6404)
Concentração (C)	4	126,6778	(<0,001)	6,0583	(<0,001)
O x L	2	1,9444	(0,0041)	6,8694	(<0,001)
O x C	8	2,6278	(<0,0001)	0,2167	(0,3861)
C x L	4	0,3889	(0,3263)	0,1000	(0,7372)
O x L x C	8	0,7222	(0,0372)	0,3625	(0,0879)
Fatorial x Adicional	1	1564,0018	(<0,0001)	355,2667	(<0,001)
Erro	77	0,329004		0,2005772	
CV (%)		4,9837		5,9714	

(P<0,05).

TABELA 3A Valores médios do diâmetro do halo de inibição de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida utilis*, *Staphylococcus aureus* e *Penicillium expansum*, em função do tratamento adicional (testemunha).

Tratamentos	Médias ¹				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Penicillium expansum</i>
Adicional	3,44 b	3,50 b	3,00 b	3,44 b	48,33 b
Fatorial	6,89 a	5,51 a	13,21 a	8,31 a	28,08 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 4A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre *Staphylococcus aureus*, em função do local (casca e folha) (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*	
	Casca	Folha
Cravo	7,5667 b	8,0000 a
Tahiti	8,7667 a	8,6667 a
Galego	8,5333 a	8,3333 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 5A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros, casca e folha sobre *Staphylococcus aureus*, em função das variedades de limão.

Locais	Médias ¹		
	Cravo	Galego	Tahiti
Casca	7,5667 b	8,5333 a	8,7667 a
Folha	8,6667 a	8,3333 a	8,0000 b

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 6A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre *Escherichia coli*, em função do local (casca e folha) (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*	
	Casca	Folha
Cravo	6,4667 b	6,6667 a
Tahiti	6,5000 b	7,3333 a
Galego	7,6000 a	7,3667 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 7A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros, casca e folha sobre *Escherichia coli*, em função das variedades de limão.

Locais	Médias ¹		
	Cravo	Galego	Tahiti
Casca	6,4667 b	7,6000 a	6,5000 b
Folha	7,3667 a	6,7333 b	6,6667 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 8A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre *Escherichia coli*, em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*				
	Concentrações (µL/mL)				
	10	20	40	80	160
Tahiti	6,0000 a	6,3333 a	6,5833 a	6,8333 a	6,7500 b
Galego	6,0833 a	6,6667 a	7,0000 a	7,1667 a	7,8333 a
Cravo	6,5000 a	7,0833 a	7,0833 a	7,4167 a	8,0000 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

TABELA 9A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros sobre *Pseudomonas aeruginosa*, em função das variedades de limão (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*
Cravo	4,9667 b
Tahiti	5,4500 b
Galego	6,1167 ab

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

TABELA 10A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais de citros, casca e folha sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Locais	Médias ¹
Casca	5,3222 b
Folha	5,7000 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 11A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais das cascas de citros sobre *Candida utilis*, em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).

Óleos	Formação do halo de inibição (mm)*				
	Concentrações (µL/mL)				
	10	20	40	80	160
Cravo	7,6667 b	9,0000 b	11,0000 c	12,3333 c	13,6667 c
Tahiti	7,6667 b	9,6667 b	12,0000 b	13,6667 b	15,6667 b
Galego	11,0000 a	12,6667 a	14,6667 a	16,0000 a	17,3333 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

TABELA 12A Valores médios do diâmetro do halo de inibição dos óleos essenciais das folhas de citros sobre *Candida utilis*, em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*				
	Concentrações (µL/mL)				
	10	20	40	80	160
Cravo	9,6667 b	11,0000 b	12,3333 c	13,0000 c	14,3333 c
Tahiti	8,6667 c	11,6667 b	15,0000 b	15,6667 b	17,6667 b
Galego	13,3333 a	15,6667 a	16,3333 a	18,0000 a	20,0000 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 13A Valores médios do diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de limão-cravo (casca e folha) sobre *Candida utilis*, em função das diferentes concentrações

Locais	Médias ¹				
	Concentrações (µL/mL)				
	10	20	40	80	160
Casca	7,6667 b	9,0000 b	11,0000 b	12,3333 a	13,6667 a
Folha	9,6667 a	11,0000 a	12,3333 a	13,0000 a	14,3333 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 14A Valores médios do diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de limão-galego (casca e folha) sobre *Candida utilis*, em função das diferentes concentrações

Locais	Médias ¹				
	Concentrações (µL/mL)				
	10	20	40	80	160
Casca	11,0000 b	12,6667 b	14,6667 b	16,0000 b	17,3333 b
Folha	13,3333 a	15,6667 a	16,3333 a	18,0000 a	20,0000 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 15A Valores médios do diâmetro do halo de inibição do óleo essencial de limão-tahiti (casca e folha) sobre *Candida utilis*, em função das diferentes concentrações

Locais	Médias ¹				
	Concentrações (µL/mL)				
	10	20	40	80	160
Casca	7,6667 b	9,6667 b	12,000 b	13,6667 b	15,6667 b
Folha	8,6667 a	11,6667a	15,000 a	15,6667 a	17,6667 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 16A Análise de variância para os óleos, local (casca e folha) e concentrações para o fungo *Penicillium expansum*, em um delineamento inteiramente casualizado.

Fonte de variação	Gl	Quadrados médios (p-valor)	
		<i>Penicillium expansum</i>	
Óleo (O)	2	715,4111	(<0,0001)
Local (L)	1	4825,3444	(<0,0001)
Concentração (C)	4	1253,1833	(<0,0001)
O x L	2	878,0778	(<0,0001)
O x C	8	80,3833	(<0,0001)
C x L	4	90,2055	(<0,0001)
O x L x C	8	123,1055	(<0,0001)
Fatorial vs Adicional	1	1191,1573	(<0,0001)
Erro	62		7,82796
CV (%)			9,738021

(P<0,05).

TABELA 17A Valores médios da avaliação dos óleos essenciais de citros, obtidos das cascas sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*				
	Concentração (µL/mL)				
	0,25	0,5	1	2	4
Galego	38,0000 a	35,0000 a	28,3333 a	20,0000 a	9,3333 a
Cravo	38,3333 a	46,6667 c	51,6667 c	50,0000 c	45,0000 c
Tahiti	43,3333 b	41,6667 b	36,6667 b	31,6667 b	15,3333 b

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 18A Valores médios da avaliação dos óleos essenciais de citros, obtidos das folhas sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das diferentes concentrações (DMS: 0,8596).

Óleos	Médias*				
	Concentração (µL/mL)				
	0,25	0,5	1	2	4
Galego	30,0000 a	26,6667 a	21,6667 b	15,0000 b	8,0000 a
Tahiti	31,6667 b	31,6667 b	23,3333c	16,6667 c	8,6667 a
Cravo	33,3333 c	26,6667 a	20,0000 a	10,0000 a	8,0000 a

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, são estatisticamente iguais, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

TABELA 19A Valores médios da avaliação do óleo essencial de limão-cravo (casca e folha) sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das diferentes concentrações.

Locais	Médias ¹				
	Concentração (µL/mL)				
	0,25	0,5	1	2	4
Folha	33,3333 a	26,6667 a	20,0000 a	10,0000 a	8,0000 a
Casca	38,3333 b	46,6667 b	51,6667 b	50,0000 b	45,0000 b

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 20A Valores médios da avaliação do óleo essencial de limão-galego (casca e folha) sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das diferentes concentrações.

Locais	Médias ¹				
	Concentração (µL/mL)				
	0,25	0,5	1	2	4
Folha	30,0000 a	26,6667 a	21,6667 a	15,0000 a	8,0000 a
Casca	38,0000 b	35,0000 b	28,3333 b	20,0000 b	9,3333 a

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.

TABELA 21A Valores médios da avaliação do óleo essencial de limão-tahiti (casca e folha) sobre o crescimento micelial do fungo *Penicillium expansum*, em função das diferentes concentrações.

Locais	Médias ¹				
	Concentração (µL/mL)				
	0,25	0,5	1	2	4
Folha	31,6667 a	31,6667 a	23,3333 a	16,6667 a	8,6667 a
Casca	43,3333 b	41,6667 b	36,6667 b	31,6667 b	15,3333 b

¹Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si, pelo teste F, com um nível nominal de significância de 5%.