



APARECIDA SÍLVIA DOMINGUES

**ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS
PUROS NO CONTROLE DE CÉLULAS
PLANCTÔNICA E SÉSSEIS DE CEPAS DE
*Bacillus cereus***

LAVRAS – MG

2015

APARECIDA SÍLVIA DOMINGUES

**ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS PUROS NO CONTROLE
DE CÉLULAS PLANCTÔNICA E SÉSSEIS DE CEPAS DE
*Bacillus cereus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS – MG

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Domingues, Aparecida Sílvia.

Óleos essenciais e seus compostos puros no controle de células
planctônica e sésseis de cepas de *Bacillus cereus* / Aparecida Sílvia
Domingues. – Lavras : UFLA, 2015.

89 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Biofilme. 2. Sanitizante. 3. Citral. 4. Cinamaldeído. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

APARECIDA SÍLVIA DOMINGUES

**ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS COMPOSTOS PUROS NO CONTROLE
DE CÉLULAS PLANCTÔNICA E SÉSSEIS DE CEPAS DE
*Bacillus cereus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dra. Patrícia Gomes Cardoso	UFLA
Dra. Maíra Maciel Mattos de Oliveira	IFES
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA
Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi	UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Microbiologia Agrícola pela oportunidade concedida para realização do doutorado;

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos;

Aos professores do Departamento de Microbiologia Agrícola e Ciência dos alimentos, pelos ensinamentos transmitidos;

À Professora Dr^a Roberta Hilsdorf Piccoli pela orientação, compreensão, paciência, amizade e dedicação sem igual, e seus ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional;

Ao Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas;

Aos meus amigos que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando, em especial à Mariana e Letícia, pela contribuição constante durante todo esse período;

À técnica de laboratório, Eliana;

Aos meus pais, Geraldo e Rita, que sempre primaram pela minha Educação;

Aos meus irmão e sobrinhos, pela compreensão de minha ausência;

Ao meu marido, meu agradecimento profundo e sincero. O tempo todo ao meu lado, incondicionalmente, compreendendo as minhas ausências constantes.

RESUMO GERAL

Biofilmes microbianos representam um grande problema para as indústrias de alimentos e sua eliminação tem sido alvo de diversas pesquisas. Assim, a primeira etapa desta pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar a atividade bactericida de óleos essenciais de cardamomo, capim – limão, tomilho, cravo e canela e o dos compostos puros citral (CIT), timol (TIM), α -terpineol (TER), cinamaldeído (CIN) e eugenol (EUG) contra células planctônicas e sésseis das cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579, ATCC11778, CCT 2897 e CCT 7453. As concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) e Concentrações Mínimas Bactericidas (CMB) foram determinadas por microdiluição em caldo. Todos os constituintes apresentaram atividade antibacteriana. As soluções de CIT e CIM, foram os constituintes que apresentaram os melhores resultados no teste anterior. Estes foram testados contra biofilmes formados sobre aço inoxidável AISI#304. CIT e CIN apresentaram efeito antibacteriano também contra células sésseis, podendo ser novas alternativas para elaboração de sanitizantes. A segunda etapa desta pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar o efeito da exposição do biofilme de *B. cereus*, durante sua formação, à concentrações subletais de CIN e CIT. Pelo número de células sésseis após 48 horas de formação, verificou-se que a exposição à concentrações subletais de CIN e CIT afetou a formação dos biofilmes das cepas de *Bacillus cereus*, podendo torná-lo mais resistente a estes compostos como também mais sensível, de maneira cruzada ou não, sendo a ocorrência destes efeitos dependente da cepa e do composto utilizado.

Palavras-chave: Biofilme. Sanitizantes. Citral. Cinamaldeído. Antimicrobiano.

GENERAL ABSTRACT

Microbial biofilms are a major problem for the food industry and their disposal has been the subject of several studies. So the first step of this research was conducted in order to evaluate the bactericidal activity of essential oils of cardamom, lemon grass, thyme, cloves and cinnamon and of pure compounds citral (CIT), thymol (TIM), α -terpineol (TER), cinnamaldehyde (CIN) and eugenol (EUG) against planktonic cells and sessile of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579, ATCC11778, CCT 2897 and CCT 7453. The concentration minimum inhibitory (CMIs) and concentration minimum bactericidal (CMBs) were determined by broth microdilution. All constituents showed antibacterial activity. The CIT and CIM solutions were the constituents that showed the best results in the previous test. These were tested against biofilms formed on stainless steel AISI # 304. CIT and CIN showed antibacterial effect also against sessile cells and may be new alternatives for the preparation of sanitizing. The second stage of this research was conducted in order to assess the exposure effect of the biofilm of *B. cereus* during their training, sublethal concentrations CIN and CIT. By the number of sessile cells after 48 hours of training, it was found that exposure to sublethal concentrations of CIN and CIT affect biofilm formation in *Bacillus cereus* strains can make it more resistant to these compounds as well as more sensitive, the Cross-way or not, the occurrence of these effects are dependent on the strain, and the compound being employed.

Keywords: Biofilms. Sanitizers. Citral. Cinnamaldehyde. Antimicrobial.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Como os microrganismos chegam às superfícies industriais e aos alimentos	12
2.2	Biofilmes na indústria de alimentos e segurança alimentar	13
2.3	Estrutura e composição do biofilme	16
2.4	Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação do biofilme	18
2.4.1	<i>Bacillus cereus</i>	19
2.5	Adaptação das bactérias a agentes antimicrobianos	21
2.6	Óleos essenciais	23
2.6.1	<i>Elettaria cardamomum</i>	24
2.6.2	<i>Cymbopogon citratus</i>	25
2.6.3	<i>Thymus vulgaris</i>	26
2.6.4	<i>Syzygium aromaticum</i>	26
2.6.5	<i>Cinnamomum cassia</i>	27
2.7	Constituintes Químicos isolados dos óleos Essenciais	28
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS	31
	CAPÍTULO 2 Ação antimicrobiana dos óleos essenciais e seus compostos sobre cepas de <i>Bacillus cereus</i>	43
1	INTRODUÇÃO	45
2	MATERIAIS E MÉTODOS	48
2.1	Óleos essenciais e compostos dos óleos essenciais	48
2.2	Microrganismos e padronização dos inóculos	48
2.3	Determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais	49
2.4	Análise Estatística	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	CAPÍTULO 3 Potencial tolerância biocida e impacto sobre a resposta adaptativa à concentrações subletais de soluções de três terpenóides e dois fenilpropanóides, em cepas de <i>Bacillus cereus</i> ...	62
1	INTRODUÇÃO	64
2	MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.1	Componentes majoritários	66
2.2	Microrganismos e padronização dos inóculos	66

2.3	Determinação das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas dos componentes sobre células planctônicas	67
2.4	Formação de biofilme por cepas de <i>Bacillus cereus</i>	68
2.4.1	Classificação da capacidade de formação de biofilme de cepas de <i>B. cereus</i>	68
2.4.2	Formação de biofilmes de cepas de <i>B. cereus</i> em cupons de aço inoxidável.....	69
2.5	Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários sobre biofilmes de cepas de <i>Bacillus cereus</i>	70
2.6	Formação de biofilme por <i>Bacillus cereus</i> em condições de estresse subletal	70
2.7	Determinação da concentração mínima bactericida dos componentes majoritários sobre biofilmes adaptados	72
2.8	Determinação da concentração mínima bactericida do citral e cinamaldeído sobre biofilmes adaptados	73
2.9	Análise estatística	74
2.9.1	Desenvolvimento do biofilme	75
2.9.2	Estudo do comportamento das células após a exposição subletal ...	75
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1	Atividade antimicrobiana em células planctônicas	76
3.2	Formação de biofilme e sua classificação.....	77
3.3	Formação de biofilme por <i>Bacillus cereus</i> em condições de estresse subletal	79
3.4	Concentração mínima bactericida em biofilmes	80
3.5	Efeito de exposição do biofilme à concentrações subletais de antimicrobianos e resistência cruzada	82
4	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS	87

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes microbianos formados por grupos de microrganismos patogênicos ou deteriorantes tem apresentado expressiva participação nas contaminações de ambientes industriais e hospitalares. Dentre os microrganismos de interesse na indústria de alimentos e na saúde destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*.

Bacillus cereus pertence ao grupo das bactérias Gram – positivas, anaeróbias facultativas e formadoras de endósporos. Tem sido amplamente relatado na literatura científica a presença de *B. cereus* em alimentos crus e processados a base de carne, legumes, arroz e produtos lácteos. Está associada a algumas doenças veiculadas por alimentos: a intoxicação emética e diarreica, causada por duas toxinas distintas, além de relatos recentes de infecção neuroinvasiva (RHEE et al., 2015).

Doenças transmitidas por alimentos é um grande problema, com enormes custos associados. As superfícies de processamento podem transportar os microrganismos para o alimento, atuando como rota de transmissão de doenças bacterianas para os seres humanos e animais. Além disso, os microrganismos patogênicos ocorrem amplamente na natureza, sendo difícil evitar que entrem em contato com alimentos crus.

A segurança alimentar tem adquirido grande importância no campo da saúde pública nos últimos anos. A melhoria na segurança dos alimentos é do interesse da indústria alimentícia, que vem usando cada vez mais agentes antimicrobianos na cadeia de produção de alimentos como maneira de controlar o crescimento microbiano, reduzir a incidência de intoxicação alimentar, deterioração e garantir alimentos seguros para os consumidores.

O uso indiscriminado desses agentes, a fim de proporcionar a segurança dos alimentos, muitas vezes expõem os microrganismos à concentrações subletais desses antimicrobianos, aumentando a possibilidade de resistência daqueles pela ativação dos mecanismos de respostas adaptativas e sobrevivência ao stress, levando ao crescimento em condições ambientais antes impróprias (DEPOORTER, et al., 2012; VAN BOXSTAEL, et al., 2012).

Nos últimos anos tem crescido a preocupação dos consumidores com os efeitos negativos dos agentes antimicrobianos tradicionais, expressando o desejo de que ocorra a redução de conservantes químicos para prevenção e controle de microrganismos patogênicos em alimentos, o que levaram os pesquisadores e os processadores de alimentos a procurar aditivos alimentares naturais com um largo espectro de atividade antimicrobiana (VERRAES et al., 2013).

Neste contexto, estão sendo feitos grandes esforços na investigação de novos antimicrobianos alternativos à base de compostos vegetais. Uma opção é a utilização de óleos essenciais como antibacterianos, esses têm boa aceitação por parte dos consumidores, por ter origem na natureza (NEREYDA, 2011; SULLIVAN et al., 2012; VERGIS, et al., 2013).

Óleos essenciais (EOS) são líquidos oleosos, aromáticos e voláteis, obtidos a partir de plantas que têm sido tradicionalmente utilizados para conservar alimentos. Os óleos essenciais são compostos por vários constituintes químicos e está bem estabelecido que a maioria deles tem amplo espectro de atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e deteriorantes de origem alimentar. No entanto, em geral, verifica-se que concentrações mais elevadas de OES são necessárias para se obter os mesmos efeitos antimicrobianos do que os compostos puros, sendo esses uma alternativa a ser estudada (KLEIN et al., 2013).

Os óleos essenciais e seus compostos são estudados para serem utilizados na indústria alimentar. A preocupação atual é a possibilidade indutora

de mecanismos de adaptação em microrganismos, se utilizado em doses subletais como conservantes e desinfetantes. As propriedades antimicrobianas de α -terpineol, citral, timol, eugenol e cinamaldeído tem sido estudadas (SHEN, et al., 2015; AZNAR, et al., 2015; VERGIS, et al., 2013; BEVILACQUA et al., 2010; PRAKASH et al., 2015).

A preocupação atual é a possibilidade indutora de mecanismos de adaptação em microrganismos, se utilizado em doses subletais como conservantes e desinfetantes.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade bactericida das soluções dos óleos essenciais de *Elettaria cardamomum*, *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum cassia*, e dos compostos individuais citral, timol, α -terpineol, cinamaldeído, eugenol, sobre células planctônicas e sésseis de cepas de *Bacillus cereus*; assim como avaliar a capacidade de cepas *Bacillus cereus* de se adaptar às soluções dos compostos individuais quando expostas à concentrações subletais dessas substâncias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Como os microrganismos chegam às superfícies industriais e aos alimentos

O processo de desinfecção e esterilização representa papel fundamental na área de prevenção e redução de doenças infecciosas na área da saúde. Estes processos são fundamentais também para a indústria alimentar (WINKELSTROTTER et al., 2013).

O processo de desinfecção e esterilização representa papel fundamental na prevenção e redução de doenças infecciosas, além de serem fundamentais para a indústria alimentar (WINKELSTROTTER et al., 2013).

Apesar dos avanços nos procedimentos de higiene, do conhecimento do consumidor, dos tratamentos e processamento de alimentos, as doenças veiculadas por alimentos contaminados por microrganismos patogênicos ainda representam uma ameaça significativa para a saúde pública em todo o mundo. Por isso, há uma pressão constante para atingir processos de higienização eficientes, a fim de cumprir os requisitos das partes interessadas (CRUZ; FLETCHER, 2012).

O processo de higienização é realizado em duas etapas distintas e subsequentes, a limpeza e sanitização. A primeira etapa consiste na limpeza, que tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais. A segunda etapa é a sanitização, que por sua vez tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos alteradores para níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008; CRUZ; FLETCHER, 2012). Esse processo é fundamental para evitar que

os microrganismos cheguem às superfícies de processamento e aos alimentos, garantindo a segurança alimentar.

A contaminação de alimentos por microrganismos deteriorantes e patogênicos custa milhões de dólares por ano para indústria de alimentos. Muitas destas contaminações podem ser atribuídas a presença de bactérias que são capazes de ligar às superfícies e são comumente encontradas em equipamentos de poliestireno, vidro, borracha, aço inoxidável. A natureza dessas estruturas dificulta o processo de higienização industrial, levando à formação de biofilmes microbianos. Além disso, os métodos convencionais de limpeza e sanitização são geralmente ineficientes em superfícies com formação de biofilme bacteriano (KORENBLUM et al., 2008, MAFU et al., 2011).

2.2 Biofilmes na indústria de alimentos e segurança alimentar

Uma grande variedade de espécies bacterianas que estão presentes nos ambientes de processamento de alimentos é conhecida por formar biofilmes em superfícies. Por causa dessa grande diversidade, as comunidades associadas às superfícies são geralmente múltiplas combinações de diferentes espécies, as quais interagem de maneiras distintas por constituir uma rede complexa e dinâmica (YANG , et al., 2012; WINKELSTROTTER et al., 2013).

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre não com células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas como comunidades sésseis (células microbianas associadas a diversos tipos de superfície), com diferentes graus de complexidade (WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003). Apesar das diferentes definições do termo “biofilme” sugeridas por pesquisadores, algumas especificidades se mantêm, como o fato de ser estruturado em comunidade microbiana sésseis, que interage entre si e com o ambiente, sendo metabolicamente ativa (NIKOLAEV;

PLAKUNOV, 2007). Tais interações desempenham um papel fundamental na formação da arquitetura biofilme e são responsáveis por funções específicas (REN et al., 2015).

Na maior parte da história da microbiologia, microrganismos foram essencialmente caracterizados por cultivo de células planctônicas e descritos com base nas características do seu crescimento em meios de cultura nutricionalmente ricos. Porém, cerca de 95 a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, alterando entre os estados planctônico e sésil (LYNCH; ROBERTSON, 2008).

Os microrganismos são frequentemente vistos como seres simples quando comparados aos organismos superiores. A redescoberta do fenômeno microbiológico, primeiramente descrita por Van Leeuwenhoek, de que os microrganismos crescem de forma agregada sobre as superfícies expostas, levou a estudos que revelaram que este é o modo predominante de vida das bactérias em todos os nichos ambientais (COSTERTON, 2004). São encontrados agregados, em camadas únicas ou em disposição tridimensional (STOODLEY et al., 2002). Quando formados por mais camadas de células, apresentam canais que possibilitam fluxo de líquido e gases, circulação de nutrientes e eliminação de compostos (MCLANDSBOOUGH et al., 2006).

Biofilmes podem ser definidos como um complexo ecossistema microbiológico formado por população microbiana desenvolvida a partir de uma única espécie ou por comunidades derivadas de múltiplas espécies microbianas aderidas a superfícies vivas (bióticas) ou inertes (abióticas) (EL ABED, et al. 2011). Um número crescente de estudos têm relatado que os biofilmes multiespécie parecem ser mais resistentes a atividade antimicrobiana do que de monoespécies (VAN DER VEEN; ABEE, 2011; GIAOURIS et al., 2013; SCHWERING et al, 2013; REN et al., 2015;)

A fixação em superfícies envolve a superfície celular da bactéria, onde pode ser encontrados estruturas que facilitam a adesão, como ácidos Teicóicos ou lipoteicóico, polissacarídeos e, em algumas espécies, a presença de uma cápsula e vários apêndices. Apêndices, como flagelos ou pili pode estender até várias vezes o comprimento da célula e é provável que seja a parte da bactéria que primeiro entra em contato com a superfície na qual o biofilme se instala (JARRELL; McBRIDE, 2008; FUENTE-NUÑEZ et al., 2013).

A adesão pelos colonizadores primários constitui a primeira etapa de formação do biofilme e caracteriza-se por apresentar interações entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas da superfície. A velocidade inicial de formação do biofilme depende da concentração de nutrientes, da afinidade das moléculas com superfície e das condições ambientais. A adesão segue alguns passos: ligação inicial reversível da bactéria, desenvolvimento do biofilme, ligação irreversível e maturação (COSTERTON et al., 2002).

A colonização microbiana das superfícies é um processo que envolve fenômenos biológicos e físico-químico, possivelmente explicada através de um modelo de desenvolvimento (MONDS; O'TOOLE, 2009). A formação começa com o contato da célula com a superfície que desencadeia uma adesão reversível através de van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas (FUENTE-NUÑEZ et al., 2013). A adesão irreversível resulta da fixação permanente de apêndices, como pili, flagelos, proteínas denominadas de adesina e/ou da produção de substância poliméricas extracelulares (EPS) (BIGGS; PAPIN, 2013).

Após a fase de amadurecimento, as células sésseis são destacadas e em seu estado planctônico podem colonizar outras superfícies e causar novas contaminações (CLONTS, 2008). O desprendimento dessas células pode culminar na disseminação de bactérias patogênicas das superfícies para os alimentos (WALTER et al., 2013);

2.3 Estrutura e composição do biofilme

Biofilmes são associações que aumentam a eficiência em tornar o microambiente mais favorável aos microrganismos (WATINICK; KOLTER, 2000). As características estruturais, capacidade de coesão, morfologia e fisiologia do biofilme são determinadas pela EPS. Os EPS atuam na aderência e defesa das células, proporcionando resistência às condições adversas como a diminuição de água e nutrientes e a presença de antimicrobianos (KOLODKIN-GAL, et al., 2012).

Grande parte da matriz (até 97%) é constituída por água, dependendo de cada biofilme e dos microrganismos presentes no mesmo, que pode ser parte da composição das células ou existir livre no meio circundante, agindo como solvente. Além da água, os EPS compõem 50-90% do carbono orgânico total. A matriz extracelular do biofilme também contém outros materiais de origem celular, incluindo DNA extracelular (eDNA). A presença de eDNA em biofilmes é devido a um número de mecanismos, incluindo a lise das células, e é acumulado no interior de biofilmes em uma rede filamentosa de estruturas tipo grade (TURNBULL; WHITCHURCH, 2012). Os biofilmes também podem conter materiais não-celulares na matriz, tais como proteínas, gorduras, minerais e materiais corrosivos. Estes materiais não-celulares são incorporados aos biofilmes a partir do ambiente circundante em que são formados (DONLAN, 2002). A composição do biofilme está representada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição da matriz do biofilme

Componentes	Porcentagem
Água	Até 97%
Células Microbianas	2-5% (várias espécies)
Polissacarídeos	1-2%
Proteínas (extracelular e resultante da lise)	<1-2%(várias, incluindo enzimas)
DNA e RNA	<1-2% (resultante da lise)
Íons	(ligados e livres)

Fonte: Surtheland (2001).

Na maioria dos biofilmes, os microrganismos constituem menos de 10% da matéria seca, enquanto a matriz pode ser responsável por mais de 90% da composição (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Os biofilmes mais antigos tendem a ter uma maior quantidade de EPS que em biofilmes mais jovens (JIAO et al., 2010). O topo e a base do biofilme tem maior densidade de células e muitas vezes existem canais para o transporte de água, nutrientes e resíduos (REN; SIMS; WOOD, 2002). As células dentro do biofilme estão sujeitas a gradientes de nutrientes, que normalmente resultam em células metabolicamente ativas, ou seja, com acesso a nutrientes na superfície intermediária do biofilme, e células metabolicamente inativas no líquido sobreposto à periferia e na superfície mais interna (PARSEK; FUQUA, 2004). Os biofilmes contêm células bacterianas em diferentes estágios de desenvolvimento fisiológicos.

A composição da matriz é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos surgem de acordo com o perfil genético dos compostos das células microbianas e fatores extrínsecos incluem o ambiente físico-químico no qual o biofilme e sua matriz estão localizados, o que, inevitavelmente, é constantemente influenciado pelo transporte de soluto e

gradientes de difusão. Devido a grande variedade de substâncias que constituem o EPS e a dificuldade de analisá-los, tem sido chamado de “matéria escura de biofilmes” (SHENG; YU; YU, 2005; FLEMMING; NEU; WOZNIAK., 2007).

De acordo com Boari et al. (2009), a estrutura das células sésseis apresentam viscoelasticidade e hidratação, e o grau de elasticidade está relacionado à interação entre a matriz e/ou proteínas e a superfície onde o biofilme será formado. A matriz polissacarídica que envolve o biofilme pode ser comparada com um sistema de enzimas imobilizadas em que o meio e as atividades enzimáticas estão em constante mudança. Entre estas, as propriedades de superfície das células mudam durante a formação do biofilme e as proteínas do EPS funcionam de forma inespecífica (KARUNAKARAN; BIGGS, 2010). O EPS forma uma espécie de crosta, sob a qual os microrganismos continuam a crescerem, formando cultivo puro ou associação com outros microrganismos, aumentando a proteção contra agressões químicas e físicas (SUTHERLAND, 2001).

A concentração, coesão, carga, capacidade de sorção, especificidade e natureza dos compostos individuais do EPS, assim como a arquitetura tridimensional da matriz (densidade, poros e canais), determina o modo de vida do biofilme (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

2.4 Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação do biofilme

Praticamente todos os microrganismos, tanto os deteriorantes quanto os patogênicos, possuem potencial para aderir e formar biofilmes em diversos tipos de superfícies. Na indústria de alimentos, o grupo de maior predominância é o das bactérias, cujas elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de

adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares os fazem aptos à formação de biofilme (NITSCHKE, 2006).

Bacillus cereus, *Escherichia coli*, *Shigella* spp. e *Staphylococcus aureus* foram detectados em biofilmes desenvolvidos nas indústrias de processamento de laticínios e ovos (SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009; JAN et al, 2011), e *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp foram isolados a partir de superfícies de equipamentos industriais em fábricas de processamento de frutos do mar (BAGGE-RAVN et al, 2003; SHI; ZHU, 2009; GUTIERREZ et al, 2009; MILLEZI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012;).

2.4.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é habitante natural dos solos, apresenta-se na forma de bastonete Gram-positivo, aeróbio facultativo, sendo caracterizado pela formação de endósporos, tendo assim duas formas morfológicas: endósporo e célula vegetativa. É conhecido por seu amplo espectro de características fenotípicas, permitindo-lhe ocupar diversos nichos ecológicos. (BOTTONNE, 2010; EHLING-SCHULZ; MESSELHAUSSER, 2013).

A capacidade de *B. cereus* em produzir e secretar certas toxinas são os mais importantes aspectos bioquímicos deste microrganismo. Inúmeras linhagens sintetizam grande variedade de metabólitos extracelulares, incluindo enzimas que podem promover a deterioração dos alimentos (STARK et al.,2013). As diferentes cepas desses microrganismos são responsáveis por vários surtos envolvendo diversos produtos, como arroz, macarrão, carne, legumes e laticínios (DELBRASSINNE et al., 2011; ELHARIRY, 2011; JAN et al., 2011; KAMGA WAMBO et al., 2011; KOTZEKIDOU, 2013). No entanto, a prevalência de *B. cereus* causando doenças transmitidas por alimentos é difícil de determinar e pode ser subestimado devido aos sintomas associados às

infecções ou intoxicações serem geralmente leves e nem sempre relatadas (CADEL SIX et al., 2012). No entanto, casos mais graves que podem levar ao óbito também têm sido relatados, demonstrando a possível gravidade da síndrome emética (DIERICK et al, 2005;. SHIOTA et al, 2010; NARANJO et al, 2011). Além de relatos recentes de septicemia e infecção neuroinvasiva em paciente imunocomprometidos (BOTTONNE, 2010; RHEE et al., 2015).

B. cereus provoca dois principais tipos de intoxicação alimentar: a emética e a diarreica. Intoxicação emética está associada com a produção de cerulide, uma toxina lipofílica. Esta toxina é extremamente estável ao calor, e pode ser produzida em alimentos contaminados por células *B. cereus*. Notavelmente, a cerulide pode persistir no corpo humano por um longo período, afetando diversos órgãos e, eventualmente, levando a morte do paciente (THORSEN et al. 2011).

A toxinfecção diarreica é causada por outro grupo de moléculas tóxicas, as enterotoxina Hemolisina, a enterotoxina não-hemolítico e a citotoxina. Essas toxinas tem alta sensibilidade ao pH baixo e as proteases digestivas impedindo o desenvolvimento de sintomas diarreicos, quando ocorre a produção no alimento. Portanto, toxinfecção ocorre devido à produção de enterotoxinas na intestino delgado pelas células *B. cereus* ou endósporos que foram ingeridas (GUINEBRETIERE et al, 2008).

B. cereus produz endósporos altamente resistente a ambientes inóspitos e são capaz de sobreviver ao calor, a ausência de água, aos procedimentos de sanitização, ao processamento de alimentos e também agregam em comunidades bacterianas chamados biofilmes (BALL et al, 2008;. SHAHEEN et al., 2010; ELHARIRY, 2011). Os estudos sobre a espécie bacteriana do mesmo gênero, o *B. Subtilis*, revelou que biofilmes são reservatórios naturais de endósporos tornando difícil a sua erradicação (BRANDA et al.,2006).

Embora a formação de biofilmes tem sido estudado em detalhe em *B. subtilis*, uma espécie muito próxima ao *B.cereus*, pouco se sabe sobre este. Porém sabe-se da relevância da motilidade e dos endósporos na adesão em superfícies abióticas (AUGER et al., 2009; VILAIN et al., 2009; HOURY et al., 2010; KARUNAKARAN; BIGGS, 2011).

As cepas de *Bacillus* tem sido estudadas por serem capazes de formar biofilmes em superfícies de metal e produzir elaboradas comunidades multicelulares que apresentam características arquitetônicas, como projeções aéreas que se estendem em toda superfície do biofilme (BRANDA et al., 2006; AUGER et al. 2009; SIMÕES, SIMÕES; VIEIRA; 2010). Outros estudos mostraram a capacidade de adesão de diferentes cepas de *Bacillus* e forneceu informações sobre potenciais mecanismos de controle para este organismo problemático. Observou-se grandes diferenças entre as cepas avaliadas em relação a capacidade e consistência do biofilme formado e a resposta aos diferentes tipos de estresse testados (ANDERSON et al, 2005; DE BEEN et al, 2011; KARUNAKARAN; BIGGS, 2011). Além disso, várias espécies resistentes de *Bacillus* foram identificadas em plantas de processamento de alimentos (VLAMAKIS et al., 2013).

2.5 Adaptação das bactérias a agentes antimicrobianos

Atualmente pode-se inferir que a resistência antimicrobiana é resultado de complexa interação entre os agentes antimicrobianos, microrganismos e meio ambiente. Assim, a versatilidade microbiana de se adequar às condições impostas, representa formidável mecanismo de defesa (FIOCRUZ, 2005).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos tem sido atribuída a mecanismos herdados e não herdados (LEVIN, 2006), que estão diretamente ligados à espécie bacteriana e ao estado fisiológico (LEVIN, 2006).

Vários estudos têm relatado que o uso de determinados sanificantes promovem pressão seletiva e contribuem para o surgimento de microrganismos resistentes a eles (LANGSRUD et al., 2003). Após a exposição regular aos sanificantes, bactérias Gram positivas apresentam tolerância a estes compostos químicos. Estudos revelaram que bactérias de mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade ao mesmo desinfetante. Além disso, desinfetante com formulações químicas similares, porém não idênticas, têm eficácia diferente contra as mesmas bactérias (SANDER et al., 2002).

Assim, é possível que a resistência dos microrganismos em biofilme a sanificantes também possa ser consequência da exposição prolongada a doses subletais destes compostos (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Apesar da base da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a sanificantes e conservantes de alimentos ainda é pouco estudada. Os mecanismos bioquímicos exatos de adaptação e de resistência permanecem largamente desconhecidos (LEVIN, 2006; BRAOUDAKI; HILTON, 2005; RUSSEL, 2003).

A preocupação com a produção de alimentos mais seguros e com o aumento da vida útil dos produtos tem levado ao uso mais frequente da sanitização química (LANGSRUD et al., 2003). Assim, se os agentes antimicrobianos e sanificantes tem o intuito de ter papel significativo no controle eficaz de patógenos de origem alimentar, os fabricantes de alimentos devem saber mais sobre o potencial de desenvolvimento de resistência entre os microrganismos alvos (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos atacam o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos alvos ou iniciam uma via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano (CHAPMAN, 2003).

De acordo com Landau; Shapira (2012), evidências moleculares e fisiológicas apontam para o fato de muitas bactérias patogênicas de origem alimentar estarem se adaptando a estresses subletais e, como consequência, tornando-se mais resistentes em níveis letais de estresse ou proteção cruzada contra outros estressores.

2.6 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIMÕES; SPITZER, 2004). Os óleos essenciais são constituídos por compostos tais como terpenos, aldeídos, ésteres, cetonas, fenóis e álcoois (RADULESCU; CHILIMENT; OREA, 2004).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas diz respeito, principalmente, aos danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (SIKKEMA et al., 1994). Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo característica de permeabilidade (SIKKEMA et al., 1994; BAKKALI et al., 2008). A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam (SIKKEMA et al., 1995), de maneira que a resistência bacteriana a óleos essenciais parece estar relacionada à habilidade de partição dos compostos dos mesmos na fase lipídica da membrana (LAMBERT et al., 2001).

Em bactérias, a permeabilidade da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de metabólitos e íons, como íons potássio e fosfato (LAMBERT et al., 2001; BAKKALI et al., 2008). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (SIKKEMA et al., 1994).

2.6.1 *Elettaria cardamomum*

A Família Zingiberaceas engloba cerca de 50 gêneros e 1100 espécies distribuídas em países tropicais, sobretudo no Extremo Oriente (SOUZA, 2005).

Elettaria cardamomum é uma espécie pertencente à família Zingiberaceae, uma das culturas de especiarias mais importantes cultivadas na Índia, Guatemala, Tanzânia, Papua Nova Guiné, Costa Rica, Sri Lanka, El Salvador, Vietnã, Laos e Camboja (LUCCHESI, 2007; PARTHASARATHY et al. 2008; TYAGI et al., 2009). É uma planta perene com raízes laterais, que podem crescer até a altura de 2,4 metros (SAJINA et al., 1997; DUBEY; YADAV, 2001). A planta é valorizada pelo seu fruto seco que é chamado de cardamomo. O fruto, juntamente as sementes, contém OE, esteróis, ácidos fenólicos e lipídios. Os frutos e as sementes do cardamomo possui em média 4% de óleos essenciais. Entre os compostos ativos encontra-se o α -pineno, sabineno, 1,8- cineol, 4-terpineol, α -terpineol, o cineol, o limoneno, o cabineno e o pineno, α -terpenyl acetato, linalool. A proporção dos constituintes no óleo é muito variável. (RÍOS et al., 2007; SERESHTI et al. 2012). O OE tem atividade antimicrobiana anti-inflamatório, analgésico e antiespasmódico (TYAGI et al., 2009; JAMAL et al., 2006). É usado principalmente como um agente aromatizante na preparação de doces, produtos de panificação, conservas de

fruta, arroz e carne. O óleo também é usado nas indústrias de perfumaria, bebidas e farmacêuticos, como um sabor e carminativa. O teor de óleo essencial de *E. cardamomum* é fortemente dependente das condições de armazenamento, mas pode ser bem elevado e possuir atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-negativas e Gram -positivas (MAHADY et al., 2005).

2.6.2 *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon é um gênero importante da família Poaceae e é representado por cerca de 120 espécies e suas variedades, em torno de 100 espécies são encontradas em países tropicais. Esse gênero tem grande importância econômica na produção de óleo essência, como por exemplo, o *C. citratus* (NEGRELLE; GOMES, 2007). É conhecida popularmente com diferentes nomes conforme a região onde se encontra: capim-limão, capim-santo, erva-cidreira, capim-catinga, capim-de-cheiro, capim-cidrão, capimcidrilho, capim-cidró e capim-ciri (COSTA et al., 2013).

Com base na medicina popular é utilizado como calmante, ministrado no preparo de chá a partir de suas folhas; analgésico em dores estomacais, abdominais e de cabeça; antifebril; antirreumático; carminativo; diurético, em distúrbios digestivos (COSTA et al, 2013).

Cymbopogon citratus contém grande variedade de constituintes químicos e uma grande proporção desses produtos é utilizada na indústria alimentícia, na perfumaria, detergentes, cosméticos, produtos farmacêuticos e inseticidas (EVANS, 1996; NEGRELLE; GOMES, 2007).

Porém, sua maior importância econômica consiste da obtenção do seu óleo essencial. Sua composição química pode variar, sendo influenciada pela diversidade genética e o habitat (SANTOS et al., 2009). O principal constituinte é o citral, uma mistura dos isômeros geranial e neral e seu conteúdo varia entre

47 a 85% (ANDRADE et al., 2009). Em menor proporção foram identificados outros constituintes químicos como o canfeno, citonelal, citronelol, farnesol, geraniol, limoneno, linalol, mentol, mircenol, nerol, a-pineno, b-pineno e terpineol (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; WEI; WEE, 2013). Estudos realizados têm demonstrado a ação antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* (NGUEFACKA et al. 2012; BASSOLÉ; JULIANI, 2012; WEI; WEE, 2013).

2.6.3 *Thymus vulgaris*

Thymus vulgaris é uma planta aromática e condimentar pertencente à família Lamiaceae, conhecida no Brasil como tomilho, arçã, arçanha, poejo, segurelha, timo. Adapta-se bem nas regiões de climas temperados quentes (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). É considerada adstringente e expectorante, com propriedades antissépticas, antifúngicas, antioxidantes e antimicrobianas (LORENZI; MATOS, 2002; SILVA JÚNIOR; BADI et al., 2004).

O óleo essencial do tomilho é rico em timol e carvacrol, sendo que outros compostos fenólicos, como taninos e flavonoides já foram encontrados em extratos da planta (SHAN, 2011).

2.6.4 *Syzygium aromaticum*

A árvore produtora de *Syzygium aromaticum*, vulgarmente conhecida como cravo da Índia, da família Myrtaceae, é endêmica nas Molucas do Norte (Arquipélago de Molucas, Indonésia), tendo sido disseminada pelos alemães durante a colonização pelas outras ilhas do arquipélago, assim como para outros países. Atualmente, Zanzibar e Madagascar são os principais produtores desta espécie, seguidos pela Indonésia. No Brasil, praticamente apenas na Bahia, esta

especiaria é produzida na forma comercial (FRAIFE-FILHO et al., 2005; CHAIEB et al., 2007; WENQIANG et al., 2007).

É muito utilizado também como condimento na culinária devido ao seu marcante aroma e sabor conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol. Ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído das folhas (GULCIN, 2012). Sua ação antimicrobiana foi demonstrada sobre vários microrganismos, incluindo ação antilisterial em carne e queijo (MATAN et al., 2006). O principal constituinte de botões de cravo é o eugenol. O óleo de cravo foi listado como uma substância "geralmente considerada como seguro" pelo FDA quando administrado em níveis que não excedam 1500 ppm nas categorias de alimentos. Além disso, os peritos em aditivos alimentares da Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram uma dose diária aceitável para o consumo humano de óleo de cravo a 2,5 mg / kg de peso corporal humano (KILDEAA et al., 2004).

2.6.5 *Cinnamomum cassia*

Cinnamomum cassia, a canela, constitui uma das mais antigas especiarias conhecidas. Sua utilização é descrita desde os tempos remotos e o controle de seu comércio foi um dos incentivadores das grandes explorações marítimas. Seu primeiro relato legítimo ocorreu em trabalhos escrito na china no século IV a.c. sobre a obtenção do óleo essencial tanto das cascas como das folhas (PRITAM, et al. 2013). Muitas propriedades biológicas têm sido estudadas e atribuídas à canela, como antioxidantes e antimicrobianas (SINGH et al., 2007). Dentre os principais compostos temos o cinamaldeído e o eugenol (PRITAM, et al. 2013). Estudos da *Cinnamomum cassia* verificou-se sua atividade antimicrobiana para *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas*

aeruginosa, mas alguns microrganismos deteriorantes de alimentos ainda não foram estudados (PRITAM, et al. 2013).

2.7 Constituintes Químicos isolados dos óleos Essenciais

Os óleos essenciais são compostos por vários constituintes químicos e está bem estabelecido que a maioria deles tem amplo espectro de atividade antimicrobiana contra agentes patogênicos e bactérias deteriorantes de origem alimentar (BASSOLÉ, et al., 2012; KLEIN et al., 2013; AZNAR et al., 2015). No entanto, em geral, verifica-se que concentrações mais elevadas de OES são necessárias para se obter os mesmos efeitos antimicrobianos do que os compostos individuais, sendo esses uma alternativa a ser estudada (KLEIN et al., 2013).

O α -terpineol é um álcool terpeno que têm demonstrado atividade antimicrobiana de largo espectro (PARK et al., 2009). Ele pode ser isolado de diferentes OE, dentre eles o de cardamomo (PARK et al., 2012).

O citral é um aldeído naturalmente encontrado nas folhas e frutos de várias espécies de plantas, incluindo árvores de murta, manjerição africano, limões, limas, capim-limão, laranja e bergamota. É constituída por uma mistura de dois isômeros, geranial e neral, e devido ao seu poderoso aroma de limão é usado para aromatizar a bebidas à base de citrinos e outros produtos (RESS et al 2003; LALKO; API 2008). O citral é geralmente reconhecido como aditivo alimentar seguro (GRAS) e foi aprovado pela Food and Drug Administration para uso em alimentos (FDA, GRAS, 21 CFR 182 · 60). Além disso, citral foi registrado pela Comissão Europeia para o uso como aromatizante em gêneros alimentícios, porque o seu uso não apresenta risco à saúde do consumidor (BURT, 2004). Levando-se em conta suas propriedades antimicrobianas, agradável aroma frutado e segurança para os consumidores, citral pode se tornar

um ingrediente antimicrobiano adequado para utilização mais ampla na indústria de alimentos. Embora seja um constituinte do óleo essencial amplamente estudada, os principais fatores que afetam a resistência microbiana ao citral, o seu mecanismo de ação antimicrobiana e a base biológica por trás da resistência microbiana não são completamente compreendidos. Sabe-se que, em geral, a membrana plasmática é o principal local de ação tóxica de terpenos (PRASHAR et al 2003; LUO et al 2004; PARK et al 2009), mas os mecanismos finais de inibição de crescimento, lesão celular e inativação não são totalmente definidas.

O timol é um monoterpene obtido do OE de tomilho e apresenta ampla atividade antimicrobiana (AZNAR, et al, 2015).

O eugenol foi relatado ter atividade antifúngica (LEE; SHIBAMOTO, 2002; MIYAZAWA; HISAMA, 2003). Como aditivo alimentar, foi classificada pelo FDA como uma substância considerada segura (GULCIN, 2012). Os altos níveis de eugenol encontrado no óleo essencial de cravo possivelmente confere a sua atividade antimicrobiana.

O cinamaldeído é o componente principal no óleo de canela e é um GRAS para uso alimentar com base em 21 CFR (Code of Federal Regulation) parte 172,515 (CFR 2009). Demonstrou ser o principal composto antimicrobiano na canela, além de exibirem atividade antibacteriana, inibindo também o crescimento de fungos e produção de microtoxinas (BEUCHAT, 1994).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O recente interesse na resistência de espécies de *B. cereus* enfatiza um problema bem reconhecido no campo da qualidade e segurança de alimentos. Este estudo mostrou que os compostos foram bem adequados no controle de células planctônica e séssil, mesmo quando sujeito a condições de stress subletais. No entanto, a exposição a concentrações subletais pode afetar biofilme *B. cereus*, podendo torná-lo muito mais resistentes a esses compostos.

A heterogeneidade das cepas frente a exposição ao estresse pode contribuir para a avaliação da otimização das margens de segurança para condições de processamento de alimentos, a fim de garantir os alimentos de qualidade e segurança alimentar.

Os resultados são importantes para uma nova linha de pesquisa a ser seguido, novos estudos para elucidar os mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência ou susceptibilidade bacteriana.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. L. et al. The isoprenoid substrate specificity of isoprenylcysteine carboxymethyltransferase: development of novel inhibitors. **Journal of biological chemistry**, Batimore, v. 280, p. 29454-29461, 2005.
- ANDRADE, E. H. A.; GUIMARÃES, E. F.; MAIA, J. G. S. Variabilidade química em óleos essenciais de espécies de Piper da Amazônia, In: 52^o Congresso Brasileiro de Química, 448, 2009, Belém. **Anais...** Belém: FEQ/UFPA. 1 CD-ROM.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. 1 ed, São Paulo: Varela, 2008. 400 p.
- AUGER S. et al. The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v.74, p. 1276–1280, 2009.
- AZNAR, A. et al. Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitaniae*. **Food Science and Technology International**, Ibaraki, v.21, p. 72-79, 2015.
- BAGGE-RAVN, D. et al. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries- analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdan, v. 87, n.3, p. 239-250, 2003.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.
- BALL, D. A. et al. Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. **Mol. Microbiol**, v.68, p.947–958, 2008.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oil in combination and Their Antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of eugenol, limonene, and citrus extract against bacteria and yeasts, representative of the spoiling microflora of fruit juices. **Journal Food Protect**, v. 73, p. 888-894, 2010.

BIGGS, M.B.; PAPIN, J.A. Novel multiscale modeling tool applied to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **PloS One**, v.8, p.78011, 2013.

BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, p. 886-895, 2009.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical of Microbiology Review**, v.23, p.382–398, 2010.

BRANDA, S. S. et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. **Mol. Microbiol.** v.59, p. 1229-1238, 2006.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, p.31–37, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CADEL SIX, S. et al. Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. **Bull. Épidémiol.**v. 50, p. 57–61, 2012.

CHAIEB, K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. myrtaceae): a short review. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.

CHAPMAN, J. S. Desinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p.271-276, 2003.

CLONTS, L. Como evitar a formação de biofilmes. **Revista Controle de Contaminação**, São Paulo, v. 109, p. 50-56, maio, 2008.

COSTA, L. C. B. et al. *Cymbopogon citratus* (Poaceae) ESSENTIAL OIL ON *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) and *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). **Biosci. J.**, Uberlândia, n. 6, v. 29, p. 1840-1847, 2013.

COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G.; STOODLEY, P. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review Microbiology**, v.56, p.187–209, 2002.

COSTERTON, W. J.; WILSON. M. Introducing em Biofilms. **Biofilms**, Reino Unido, v 1, p. 1-4, Mai.2004.

CRUZ, C. D.; FLETCHER, G. C. Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Vurrey, v.26, p. 194–199, 2012.

DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. **Food technology**, v. 56, p. 69-78, 2002.

DELBRASSINNE L. et al. Follow-up of the *Bacillus cereus* emetic toxin production in penne pasta under household conditions using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Food Microbiol.** v.28, p.1105–1109, 2011.

DEPOORTER, P. et al. Assessment of human exposure to 3rd generation cephalosporin resistant *E. coli* (CREC) through consumption of broiler meat in Belgium. **Int. J. Food Microbiol**, v.159, p.30–38, 2012.

DIERICK, K. et al. Fatal Family Outbreak of *Bacillus cereus*-Associated Food Poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, n. 8, v. 43, p. 4277–4279, Aug. 2005.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881–890, 2002.

DUBEY, A.K.; YADAV, D.S. Comparative performance of different varieties of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) under mid altitude of Arunachal Pradesh. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, n. 2, v. 10, p. 119-122, 2001.

EHLING-SCHULZ M.; MESSELHAUSSER, UTE. *Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. **Front microbial**, v.4, p.147–164, 2013.

EL ABED, S.; MOSTAKIM, M.; BERGUADI, F.; LATRACHE, H.; HOUARI, A.; HAMADI, F.; IBNSOUDA, S.K. Study of microbial adhesion on some wood species: theoretical prediction. **Microbiology**, v. 80, p 43-49, 2011.

ELHARIRY, H. M. Attachment strength and biofilm forming ability of *Bacillus cereus* on green-leafy vegetables: cabbage and lettuce. **Food Microbiol.** v.28, p. 1266–1274, 2011.

EVANS, e. C. Orders and Families of Medicinal Plants. In: **Pharmacognosy**. 4 ed 4. B Saunders Company Ltda, 1996. 120 p.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ (FIOCRUZ/LRNCEB/LAB). Manual de Procedimentos para Determinação da Suscetibilidade Antimicrobiana em Enterobactérias, 2005. (1 CD ROOM).

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. **Journal Bacteriology**, New York, v. 189, p.7945–7947, Nov. 2007.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Natures Reviews Microbiology**, London, v.8, p.623-633, aug. 2010.

FRAIFE-FILHO, G. A.; CÉSAR, J. O.; RAMOS, J. V. Cravo-da-india. Radar Técnico; CEPLAC. 2005. Disponível em <http://www.ceplac.gov.br/radar.htm>. Acesso em: mar. 2014.

FUENTE-NÚÑES, C. et al. E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Currente Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 580-589, 2013.

GIAOURIS, E. et al. Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. **PloSOne**,v. 8, p. 77276, 2013.

GUINEBRETIERE M. H. et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. **Environ. Microbiol.**v.10, p. 851–865, 2008.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Arch Toxicology**, v. 86, p. 345-391, 2012.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**. v. 26, p. 142–150, 2009.

HOURY, A. et al. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. **Microbiology**, v.156, p. 1009- 1018, 2010.

JAMAL, A. et al Gastroprotective effect of cardamom, *Elettaria cardamomum* Maton. fruits in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 103, p.149–153, 2006.

JAN, S. et al. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. **Food Microbiol**, London, v.28, p.261-265, 2011.

JARRELL, K. F.; MCBRIDE, M. J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. **Nat Rev Microbiol**. v.6, p. 466–476, 2008.

JIAO, Y.Q. et al. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 2916–2922, 2010.

KAMGA WAMBO G. O. et al. The proof of the pudding is in the eating: an outbreak of emetic syndrome after a kindergarten excursion, **Euro Surveill**. Berlin, v.16, p.19839, 2011.

KARUNAKARAN, E. BIGGS, C. A. Mechanisms of *Bacillus cereus* biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.89, p.1161–1175, 2011.

KILDEAA, M. A.; ALLANB, G.L.; KEARNEY, R.E. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S from the edible tissue of silver perch (*Bidyanus bidyanus*). **Aquaculture**, v 232, p. 265-277, 2004.

KLEIN, G.; RUBEN, C.; UPMANN, M. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 67, p. 200–208, 2013.

KOLODKIN-GAL, I. et al. A self-produced trigger for biofilm disassembly that targets exopolysaccharide. **Cell** v. 149, p. 684-692, 2012.

KORENBLUM, E. et al. Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 79, p. 97-103, March 2008.

KOTZEKIDOU P. Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. **Food Microbiology**, v. 34, p.337-343, 2013.

LALKO, J.; API, A.M. Citral: identifying a threshold for induction of dermal sensitization. **Regul Toxicol Pharmacol**.v.52, p.62–73, 2008, 2008.

LAMBERT, R.J.W. et al. Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LANDAU, E.; SHAPIRA, R. Effects of subinhibitory concentrations of menthol on adaptation, morphological, and gene expression changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 78 n. 15 p. 5361–5367, August 2012.

LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, p. 283-290, 2003.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO ,T. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry]. **Food Chem**. v.74, p. 443- 448, 2002.

LEVIN, B. R.; BONTEN, M. J. M. Cycling antibiotics may not be good for your health. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.v. 101, p.13101–13102, 2004.

LIU, T. T.; YANG, T.-S. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International Journal of Food Microbiology**. v.156, p. 68–75, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brail: nativas e exóticas**. Plantarum, nova odessa: são paulo, 2003.

LUCCHESI, M.E. et al. Solvent free microwave extraction of *Eletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. **J. Food Eng.**, 79, p. 1079, 2007.

LUO, M. et al. Effects of citral on *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex microanalysis techniques. **Acta Biochim Biophys Sin**, v.36, p.277–283, 2004.

LYNCH, A. S.; ROBOTOSN, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 9, p. 415-428, 2008.

MAFU, A.A. et al. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: Influence of pH of culture. **Int J Microbiol** v.1 p. 1-9, 2011.

MAHADY, G. B. et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytother Res**. v. 19, p. 988-91, 2005.

MATAN, N. et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, n.2, p.180-5, 2006.

MILLEZI, F.M. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J Food Saf.**;v.32, p.351–359, 2012.

MIYAZAWA, M.; HISAMA, M. Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). **J. Agric. Food Chem.** v.51,p. 6413-6422, 2003.

MONS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol.** v. 17, p. 73–87, 2009.

NARANJO, M. et al. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. **J. Clin. Microbiol.** v.49, p.4379– 4381, 2011.

NEGRELLE, R.R.B.; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 9, p. 80–92, 2007.

NEREYDA E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. **Ra Ximhai**, v.7, p.153-170, 2011.

NGUEFACKA, J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 377-383, 2012.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm: "City of Microbes" or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, London, v. 76, n.2, p 125-138, Apr. 2007.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Cinnamom essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surface. **European Food Research & Technology**, v.234, p. 821-832, 2012.

PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes* **Fitoterapia**, Milano, v. 80, p. 290–296, 2009.

PARSEK, M. R.; FUQUA, C. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, n.14, v. 186, p. 4427-4440, July, 2004.

CHEMPAKAM, B. SINDHU, S. Small cardamom. In: PARTHASARATHY, V.A.; CHEMPAKAM,B.; ZACHARIAH, T. J. **Chemistry of Spices**, Wallingford, Oxon, CAB International; 2008, p. 41–69.

PRAKASH, B. et al Efficacy of *Angelica archangelica* essential oil, phenyl ethyl alcohol and α - terpineol against isolated molds from walnut and their antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2220-2228, 2015.

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

PRITAN, D. N. et al. Compararison of antimicrobial activity of *Cinnamomum zeylanicum* and *Cinnamomum cassia* on food spollage bacteria and water borne bacteria. **Scholars Research Library der Pharmacia Letter**.v.5, p. 53-59, 2013.

QIBLAWI, S. et al. Chemopreventive Effects of Cardamom (*Elettaria cardamomum* L.) on Chemically Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. **Journal of Medicinal Food**. v. 15, p. 576-580, 2012.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OREA, E. Capillary gas chromatography-mass spectrophotometry of volatile and semi volatile compounds of *Salvia officinalis*. **Journal of chromatography**, v.1027, p.121-126, 2004.

REN, D. et al. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. **The ISME Journal**, v.9, p.81–89, 2015.

REN, D.; SIMS, J. J.; WOOD, T. K. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)- 3-butyl-2(5H)-furanone. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 293–299, Jan. 2002.

RESS, N.B. et al. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated citral in rats and mice. **Toxicol Sci**. v.71, p.198–206, 2003.

RHEE, C. et al. Epidemiologic Investigation of a Cluster of Neuroinvasive *Bacillus cereus* Infections in 5 Patients With Acute Myelogenous Leukemia. **Oxford University Press on behalf of the Infectious**, V, 27, 2015.

RÍOS L. et al. Extracción y caracterización de aceite de cardamomo (*Elettaria cardamomum*). **DYNA Revista Fac Nac Minas**, Medellin, v.74, n. 151, p. 47-52, Mar. 2007.

SAJINA, A. et al. Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). **Journal of Spices and Aromatic Crops**, India v. 6, n. 2, p. 145-148 1997.

SANDER, J. E. et al. Investigation of Resistance of Bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Diseases**, Washington, v. 46, p. 997-1000, 2002.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

SCHWERING, M. et al. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. **Biofouling**, v. 29, p. 917-928, 2013.

SERESHTI, H. et al. Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of *Elettaria cardamomum* Maton essential oil. **Journal of Chromatography**, v 1238 p. 46-53, 2012.

SHAHEEN, R. et al. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. **Food Microbiol.** v.27, p.347–355, 2010.

SHAN, B. et al. Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. **J. Med. Food.** p. 14, p. 284-290, 2011

SHEN, S. et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, v. 47, p. 196-202, 2015.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; YU, Z. Extraction of the extracellular polymeric substances from a photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 67, p.125–130, 2005.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science e Technology**, v. 3, p 1-7, 2009.

SHIOTA M. et al. Rapid detoxification of cereulide in *Bacillus cereus* food poisoning. **Pediatrics**, v.125, p. 951–955, 2010.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Mar. 1994.

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

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, p. 467-495, 2004.

SIMÕES, M; SIMÕES, L.C; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p. 573–583, 2010.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v.5, n. 9, p. 1650-1661, 2007.

SOUZA, E.L. et al. Combined application of *Origanum vulgare* l. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 40, p. 387–393, 2009.

STARK, T. et al. Mass spectrometric profiling of *Bacillus cereus* strains and quantitation of the emetic toxin cereulide by means of stable isotope dilution analysis and HEp-2 bioassay. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 405, p. 191–201, 2013.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-2009, Jan. 2002.

SULLIVAN, G. A. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using natural antimicrobials in no-nitrate or nitrite added ham. **J. Food Protect.**, v.75, p.1071-1076, 2012.

SURTHELAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, p. 3-9, 2001.

THORSEN, L. et al. Formation of cereulide and enterotoxins by *Bacillus cereus* in fermented African locust beans. **Food Microbiol.** v.28, p.1441–1447, 2011.

TURNBULL, L.; WHITCHURCH, C.B. Explosive cell lysis in bacterial biofilms produces membrane vesicles and extracellular DNA. In: Australian Society for Microbiology Annual Scientific Meeting, 20, 2012, Australian. **Anais...** 6th ASM conference on biofilms, 2012, 1CD-ROOM.

TYAGI, D. K. Characteristics and natural product investigations of essential oil from the rhizomes of *Alpinia calcarata* rose. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.** v. 4, p. 236-239, 2013.

TYAGI, R.K. et al. A. Micropropagation and slow growth conservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). **In Vitro cellular & Developmental Biology - Plant.** v.45, p. 721-729, 2009.

VAN BOXSTAEL, S. et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella* Typhimurium isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. **Food Res. Int.** v.45, p. 913–918, 2012.

- VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **Int. J. Food Microbiol**, v. 144, p. 421- 431, 2011.
- VERGIS, J. et al. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 55, p. 1320-1323, 2015.
- VERRAES, C. et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Basel, v.10, p. 2643e2669, 2013.
- VILAIN, S. et al. DNA as an adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Appli Environ Microbiol.**, v.75, p. 2861-2868, 2009.
- VLAMAKIS H. et al. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nat Rev Microbiol**, v.11, p. 157–168, 2013.
- WALTER, M. et al Detachment characteristics of a mixed culture biofilm using particle size analysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 1140-1147, 2013.
- WATINICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, May 2000.
- WEBB, J. S.; GIVSKOV, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilmes: prokaryotic adventures in multicelularity. **Current Opinion inMicrobiology**, v. 6, p. 578-585, 2003.
- WEI, L. S. WEE, W. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iran Journal Of Microbiology**, v. 5, p. 147-152, 2013.
- WENQIANG, G. et al. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods Chemistry of essential oils. **Food Chemistry**, v.101, p.1558-1564, 2007.
- WINKELSTROTTER, L .K.. et al. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microb. Ecology**, v. 1, p. 12, 2013.
- YANG, L. et al. Combating biofilms. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 65, p. 146 – 157, 2012.

CAPÍTULO 2 Ação antimicrobiana dos óleos essenciais e seus compostos sobre cepas de *Bacillus cereus*

RESUMO

Bacillus cereus é uma bactéria formadora de esporos, causadora de deterioração de alimentos e toxinfecção alimentar, com capacidade de formar biofilme, sendo seu controle de grande interesse na indústria de alimentos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a concentração mínima inibitória e a concentração mínima bactericida dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Elettaria cardamomum*, *Syzygium aromaticum* e *Cinnamomum cassia*, e dos seus compostos puros, citral, timol, α -terpineol, cinamaldeído e eugenol, sobre diferentes cepas de *B. cereus*. O óleo essencial de *C. citratus* e do *C. cassia*, e seus compostos químicos individuais, citral e cinamaldeído, respectivamente, apresentaram os melhores resultados para todas as cepas testadas. As CMI e CMB para o óleo essencial de capim-limão e citral foram iguais para todas as cepas de *B. cereus* estudadas, 1,2 e 0,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente. Já para a canela, houve variação da CMI e CMB, entretanto, para a maioria das cepas, a CMI foi de 0,6 e a CMB de 1,2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Portanto, resultados bem semelhantes, mostrando que a atividade antimicrobiana desses óleos essenciais, está associada, principalmente, aos seus compostos majoritários.

Palavras-chave: Citral. Cinamaldeído. Toxinfecção alimentar. *Thymus vulgaris*. *Elettaria cardamomum*.

ABSTRACT

Bacillus cereus is a spore-forming bacteria, causes food spoilage and food poisoning, with ability to form biofilm, such their control, of great interest in the food industry. The objectives of this study were to evaluate the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Thymus vulgaris*, *Elettaria cardamomum*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum cassia* , and its individual chemical compounds, citral, thymol, α -terpineol, cinnamaldehyde, eugenol on different strains of *B. cereus*. The essential oil of *C. citratus* and *C. cassia* and its individual chemical compounds citral and cinnamaldehyde, respectively, showed the best results for all tested strains.

Key-words: *Bacillus cereus*. Essential oil. Pure compounds.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus cereus pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas, formadoras de endósporos, sendo classificado como patógeno humano emergente. Em 2009, foi considerado a terceira causa mais importante de incidentes coletivos de toxinfecção alimentar na Europa, precedido apenas por *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* (EFSA J. 2009). No entanto, doenças de origem alimentar causadas por *B. cereus*, são, em grande parte, sub-relatadas, pois seu relato não é obrigatório. São várias as estirpes de *B. cereus* observadas como sendo capazes de causar doença de origem alimentar (NARANJO et al., 2011; RAMARAO, 2012; RHEE et al., 2015).

Em todo o mundo, há grande número de cepas bacterianas resistentes a múltiplas drogas, aumentando a morbidade, os custos inerentes à saúde pública, e as taxas de mortalidade devido a infecções (DIAS; MONTEIRO, 2010).

No que diz respeito a crescente importância dada às infecções bacterianas, e o desenvolvimento progressivo da resistência antimicrobiana, grande número de estudos têm sido realizados com produtos naturais, em busca de nova perspectiva de antimicrobiano (STOJKOVIC et al., 2011; MILLEZI et al., 2012; MILLEZI et al., 2013). Muitas plantas foram avaliadas, não apenas pela sua atividade antimicrobiana direta, mas também como agente modificador de resistência (SCHALLENBERGER et al., 2010). Além disso, nos últimos anos, a busca por substâncias antimicrobianas naturais, como os óleos essenciais, tornou-se popular devido às demandas de produtos mais naturais e seguros.

Os óleos essenciais de plantas são misturas complexas de substâncias voláteis isoladas por diferentes processos físicos. Ao longo da história, os óleos essenciais vêm sendo empregados como agentes antimicrobianos, e recentemente, vêm sendo usados em grande número de fármacos, alimentos e

cosméticos, uma vez que estes óleos são capazes de inibir de forma ampla e eficaz, o crescimento de várias espécies de microrganismos, com menos efeitos colaterais, do que os agentes antimicrobianos tradicionais (NEREYDA, 2011).

Apesar do uso generalizado dos óleos essenciais, pouco se conhece sobre seu potencial de ação, sendo necessário ainda, muitos estudos nesse campo. Assim, muitos pesquisadores têm colaborado na caracterização e confirmação das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de diferentes plantas (PARK et al., 2009; ABDELWAHAB et al., 2010; RANA, et al., 2011; STOJKOVIC et al., 2011; MILLEZI et al., 2012; MILLEZI et al., 2013; OLIVEIRA, et al., 2012; OLIVEIRA; BRUGNERA; PICCOLI 2013; AZNAR et al., 2015).

A atividade antimicrobiana é uma das mais importantes propriedades dos óleos essenciais. Assim, conhecer o efeito inibitório dos óleos essenciais e dos compostos individualizados, é fundamental para elucidar a ação destes (LIU; YANG, 2012; AZNAR et al., 2015). A partir disso, é possível entender a importância relativa do componente individual do óleo essencial, em toda a sua atividade antimicrobiana.

A maioria dos estudos tem sido realizada com os óleos essenciais (OLIVEIRA et al., 2010; MILLEZI et al., 2012; OLIVEIRA, et al., 2012; MILLEZI et al., 2013). No entanto, os compostos individuais dos óleos essenciais, são estruturalmente diferentes, e por terem propriedades químicas distintas, tais como volatilidade e estabilidade oxidante, podem apresentar atividade antimicrobiana diferente do óleo essencial.

Portanto, os objetivos deste estudo foram investigar a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Cinnamomum cassia* (canela), *Syzygium aromaticum* (cravo), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Thymus vulgaris* (tomilho); e a ação

individual dos compostos α -terpineol, cinamaldeido, eugenol, citral e timol sobre cepas de *B. cereus*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais e compostos dos óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) de cardamomo, canela, cravo, capim-limão e tomilho foram adquiridos da FERQUIMA Ind. e Com. LTDA, e os compostos puros α -terpineol (pureza = 90%), cinamaldeído (pureza = 93%), eugenol (pureza = 99%), citral (pureza = 95%) e timol (pureza = 99,5%), foram adquiridos da Sigma – Aldrich. Grau de pureza fornecido pela Sigma – Aldrich.

2.2 Microrganismos e padronização dos inóculos

Foram utilizadas as cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* CCT 2897 e *B. cereus* CCT 7453. Durante todo o experimento, as cepas foram estocadas em meio de congelamento (15 mL glicerol; 0,5 g peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura e 0,5 g NaCl; 100 mL de água destilada, pH 7,2-7,4). A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. A cepa foi reativada pela transferência de alíquotas da cultura estoque, e foram transferidas para caldo Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Índia), com auxílio de alça de repicagem. Foram realizados três repiques consecutivos, com incubação a 32°C por 24 horas. Após a terceira repicagem, a cultura foi estriada em Agar Triptona de Soja (TSA) (Himedia®, Índia) e incubada a 32 °C por 24 horas. As colônias formadas na superfície de TSA foram removidas e transferidas para 50 mL de caldo BHI, e incubadas a 32 °C. O crescimento foi monitorado por leituras periódicas em espectrofotômetro (CARY Varian Inc.), (D.O 600 nm) e plaqueamento em superfície em TSA, e incubação a 32 °C por 24h. A cultura foi padronizada em 10^8 UFC.mL⁻¹.

2.3 Determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida dos óleos essenciais

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos EOs foi determinada utilizando-se a técnica da microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (M7-A6) (NCCLS,2003), com adaptações.

Para tanto, soluções de BHI acrescidas de 0,5% de Tween 80, e de óleos essenciais ou compostos dos óleos essenciais, foram preparadas nas concentrações de 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6; 0,3; e 0,0 $\mu\text{L. mL}^{-1}$. Alíquotas de 150 μL dessas soluções foram adicionadas nas cavidades.

Previamente, as culturas estoque foram inoculadas em 50 mL de caldo BHI e incubadas a 32 °C por 24 h. Após esse período, as culturas foram padronizadas em 10^5 UFC. mL^{-1} (LIU; YANG, 2010). Alíquotas de 10 μL dessa cultura foram adicionadas às soluções contendo os óleos essenciais, ou compostos dos óleos essenciais, previamente dispensadas nas cavidades das microplacas. Estas foram tampadas e incubadas a 32 °C por 24h. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada por avaliação visual do crescimento bacteriano pela turvação do meio. Em seguida, a concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada verificando-se o crescimento celular em placas contendo TSA. Como controle positivo, foi utilizado caldo BHI inoculado com *B. cereus*, sem adição de óleo ou componente testados. Para o controle negativo utilizou-se caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80, e óleo essencial ou seus componentes. Todo o experimento foi realizado em triplicata e três repetições. A CMI foi definida como a menor concentração de óleo essencial e dos seus compostos, que resultou na ausência de crescimento visível em caldo; e a CMB foi definida como a menor concentração do óleo essencial e

de seus compostos, que resultou na ausência de crescimento de *B. cereus* em placa.

2.4 Análise Estatística

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para confrontar tratamentos independentes. Com análise significativa ($p < 0,05$) foram aplicados os testes de Dunn e o de Student-Newman-Keuls, para comparações múltiplas entre os tratamentos (Programa SPSS 19.0).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da CMI e CMB dos cinco óleos essenciais estão apresentados na Tabela 1.

Os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações abaixo de $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, exceto os óleos essenciais de cardamomo e tomilho, onde a atividade antimicrobiana ocorreu em concentrações acima de $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

Os óleos essenciais de canela e capim-limão foram os mais eficazes sobre todas as cepas *B. cereus* avaliadas, tanto para a atividade bactericida, quanto para a bacteriostática. O óleo essencial de canela apresentou CMI de $1,2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para todas as cepas, e o óleo essencial de capim -limão apresentou CMI de $1,2 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para *B. cereus* ATCC 14579 e $0,6 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para as demais cepas.

Na Tabela 2, são mostrados os resultados da atividade bacteriostática e bactericida dos compostos puros sobre as cepas de *B. cereus*.

Os compostos avaliados apresentaram atividade antimicrobiana em concentrações abaixo de $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para todas as cepas testadas. Os valores de CMI e CMB para os compostos mostraram que os mais eficazes, para todas as cepas estudadas, foram o cinamaldeído e o citral (compostos majoritários dos óleos essenciais de canela e capim-limão). O cinamaldeído e o citral apresentaram atividade bacteriostática e bactericida em concentrações abaixo de $1,2 \mu\text{L.mL}^{-1}$, demonstrando maior efeito antimicrobiano comparado aos demais compostos testados.

Tabela 1 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais para estirpes de *Bacillus cereus*

<i>Bacillus cereus</i>	Óleo Essencial ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)									
	<i>E. cardamomum</i>		<i>C. cassia</i>		<i>S. aomaticum</i>		<i>C. citratus</i>		<i>T. vulgaris</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
ATCC 14579	40	40	1,2	1,2	2,5	5,0	1,2	1,2	20	20
ATCC 11778	40	40	0,6	1,2	2,5	2,5	1,2	1,2	40	40
CCT 7453	20	20	0,6	1,2	5,0	5,0	1,2	1,2	20	20
CCT 2897	20	20	0,6	0,6	5,0	5,0	1,2	1,2	40	40

Tabela 2 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos puros para estirpes de *Bacillus cereus*

<i>Bacillus cereus</i>	Componente ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)									
	α -terpineol		Cinnamaldeido		Eugenol		Citral		Timol	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
ATCC 14579	5	5	1,2	1,2	2,5	2,5	0,6	0,6	2,5	2,5
ATCC 11778	5	5	0,6	0,6	5,0	5,0	0,6	0,6	2,5	2,5
CCT 7453	2,5	2,5	0,6	1,2	1,2	2,5	0,6	0,6	2,5	2,5
CCT 2897	5	5	0,6	0,6	5,0	5,0	0,6	0,6	0,6	0,6

As cepas avaliadas apresentaram variada sensibilidade aos óleos essenciais e aos compostos puros. Delgado et al. (2004), avaliando diferentes cepas de *B. cereus* a antimicrobianos naturais, também encontraram diferentes graus de sensibilidade aos compostos testados, para as cepas estudadas.

O gênero *Bacillus* é reconhecido como sendo geneticamente mais heterogêneo do que a maioria dos outros gêneros de bactérias. As espécies do mesmo gênero, da maioria das bactérias, geralmente não se diferem mais do que 10 a 15% na sua composição de bases de DNA, ao passo que as estirpes de *Bacillus* têm variação de 32 a 69% de teor G + C (ZWICK et al., 2012; CARLSON et al., 1992). Esta variabilidade genética pode fazer as estirpes apresentarem resistência variada aos mesmos antibacterianos.

A estrutura química dos compostos dos óleos essenciais influencia seu modo de ação sobre a célula bacteriana. Devido à variabilidade de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, observa-se que a atividade antibacteriana não é atribuída somente a um mecanismo específico, havendo múltiplos alvos na célula bacteriana (LV et al., 2011; ZWICK et al., 2012). Os mecanismos de ação dos óleos podem afetar outros alvos além de seu alvo principal (BURT, 2004). Foi demonstrado entre os mecanismos, que os óleos essenciais, por serem lipofílicos, atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática, interrompendo sistemas enzimáticos, comprometendo o material genético da bactéria (BURT et al., 2007; DE SOUZA et al., 2010; LV et al., 2011; BAJPAI; BAEK; KANG, et al. 2012).

Confirmando os resultados encontrados nesse trabalho, estudos realizados anteriormente demonstraram que os compostos testados podem ser considerados agentes antimicrobianos de largo espectro (RAYBAUDI-MASSILIA et al. 2008; PEI, et al., 2009; GALLUCCI, et al., 2010; OLIVEIRA et al. 2012; LIANG, et al., 2015).

O citral e o óleo essencial de capim-limão apresentaram efeitos similares sobre as cepas de *B. cereus*. As cepas avaliadas também apresentaram a mesma sensibilidade para o óleo essencial de canela e o composto cinamaldeído. Esse resultado pode ser explicado, uma vez que o óleo de capim-limão e canela possuem o citral (65-85%) e o cinamaldeído (75-90%) como componentes majoritários, respectivamente (CHANTHAI et al. 2012; NG; WU, 2011).

Embora haja considerável variabilidade na composição dos óleos essenciais, obtidos de diferentes espécies de canela e capim-limão, observa-se que esses contêm em maior quantidade em relação aos demais compostos, o cinamaldeído e o citral, respectivamente (WANG et al., 2009; CHANTHAI et al. 2012). Assim, os valores encontrados para as cepas avaliadas nesse trabalho, são indicativos de que o efeito dos óleos essenciais de capim limão e canela está relacionado à presença do citral e cinamaldeído, respectivamente.

O cinamaldeído, um fenilpropanoide, não está associado à ruptura da membrana celular, mas pode inibir a atividade de várias enzimas celulares e proteínas, devido a sua facilidade de penetração na célula, em função da solubilidade em água (KHAYYAT; SADDIQ, 2015). Essa solubilidade se deve ao grupo carbonila livre do cinamaldeído, o qual pode reagir prontamente com os grupos amino livres dos aminoácidos, formando adutos bases Schiff (FEHN ET AL., 2001), cuja principal vantagem é a sua solubilidade em água.

Para a maioria dos óleos essenciais e compostos testados, a CMB apresentou valor igual à CMI, exceto para o cinamaldeído e o eugenol, que apresentaram valores de CMB maior que a CMI. Estudo realizado por Kwon et al. (2003), demonstrou que o cinamaldeído pode inibir a divisão celular de *B. cereus*, impedindo o aumento do número de células no meio de cultivo, sem levar à morte celular.

Ao comparar os resultados obtidos para as diferentes cepas de *B. cereus* utilizadas (Tabelas 1 e 2), verifica-se que a sensibilidade *B. cereus* é dependente

da cepa e do óleo essencial e compostos utilizados. Isso demonstra o risco da tomada de decisão, de se utilizar um antimicrobiano natural baseada na análise de apenas uma cepa, ou de apenas um óleo essencial ou composto.

4 CONCLUSÃO

De maneira geral, enfatiza-se que a avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e seus constituintes sobre células planctônicas, deve ser a etapa inicial para selecionar os agentes mais ativos a serem posteriormente avaliados, como conservantes naturais em alimentos, ou como constituintes de soluções sanificantes.

Quanto ao efeito antibacteriano sobre as cepas de *B. cereus*, com base nos resultados de todas as quatro cepas testadas, os compostos são eficientes para a inativação destas, podendo ser novas alternativas para o controle de *B. cereus* em indústrias de alimentos.

REFERÊNCIAS

AZNAR, A. et al. Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*. **Food Science and Technology International**, Ibaraki, v.21, p. 72-79, 2015.

Anonymous. The community summary report on food-borne outbreaks in the European Union in 2007. **EFSA J.** 2009.

BAJPAI V. K.; BAEK K. H.; KANG S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, Essex, v. 45, p.722–734, 2012.

BURT S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, 4484–4490, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p.223-53, 2004.

CARLSON, L. L. PAGE, A. W. BESTOR, T. H. Localization and properties of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor NY, v. 6, p. 2536–2541, 1992.

CHANTHAI, S. et al. Influence of extraction methodologies on the analysis of five major volatile aromatic compounds of citronella grass (*Cymbopogon nardus*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) grown in Thailand. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.95, p.763-772, 2012.

DE SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.137, p.308-311, 2010.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S. Antibióticos e Resistência Bacteriana, Velhas Questões, Novos Desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia. Clínica, Investigação e Inovação**, v.1, p. 1-10, 2010.

DELGADO, B. et al. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 327-334, 2004.

FEHN, A. et al. Metal complexes with biologically important ligands. CXXVII. Half-sandwich complexes of ruthenium, rhodium and iridium as well as phosphine-containing palladium- and platinum (II) complexes with Schiff bases from amino acid anions and aldehydes. **Journal of Organonic Chemistry**, Washington, v.621, p. 109–119, 2001.

GALLUCCI, M.N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour Fragr. J.**, v. 24, p. 348–354, 2009

KHAYYAT, S.; SADDIQ, A. A. Photochemical and Antimicrobial Studies of *Cinnamaldehyde* and its Bioactive Derivatives. **Asian Journal of Chemistry**, v.27, p. 3023-3027, 2015.

KWON, J.A.; YU, C.B.; PARK, H.D.; Bacterial effects and inhibition of cell separation of *cinnamic aldehyde* on *B.cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 37, p.61–65, 2003.

LIANG, D. et al. Inhibitory Effect of Cinnamaldehyde, Citral, and Eugenol on Aflatoxin Biosynthetic Gene Expression and Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.1, p 325-333, 2015

LIU, T. T.; YANG, T.-S. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.156, p. 68–75, 2012.

LV F.; LIANG H.; YUAN Q.; LI C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, Essex, v.44, p.3057–3064, 2011.

MILLEZI, F.M. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**; v.32, p.351–359, 2012.

MILLEZI, F.M. et al. Reduction of *Aeromonas hydrophila* biofilm on stainless steel surface by essential oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.44, p. 73–80, 2013.

NARANJO, M. *et al.* Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v.49, p.4379–4381, 2011.

NEREYDA E. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. **Ra Ximhai**, v.7, p.153-170, 2011.

NG, L. T.; WU, S. J. Antiproliferative activity of *Cinnamomum cassia* constituents and effects of pifithrin- α on their apoptotic signalling pathways in Hep G2 Cells, **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2011, p. 492148, 2011.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. *Cinnamom essential oil and cinnamaldehyde* in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surface. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.234, p. 821-832, 2012.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Essential oils of thyme and Rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.44, p. 1181-1188, 2013.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. Essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Vurrey, v.1, n.4, p. 549-543, 2010.

PARK, M. J. et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes **Fitoterapia**, Milano, v. 80, pp. 290–296, 2009.

PEI, R.S.; ZHOU, F.; JI, B.P.; XU, J. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, p.379–383, 2009.

RAMARAO, N. *Bacillus cereus*: Caractéristiques et pathogénicité. **EMC Biol. Méd.** v.7, p. 1–11, 2012.

RANA, I. S.; RANA, A. S.; RAJAK, R. C. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v 42, n 4, 2011.

RAYBAUDI-MASSILIA R. M.; MOSQUEDA-MELGAR J.; MARTÍN-BELLOSO O. Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.121, 313–327, 2008.

RHEE, C. et al. Epidemiologic Investigation of a Cluster of Neuroinvasive *Bacillus cereus* Infections in 5 Patients With Acute Myelogenous Leukemia. **Oxford University Press on behalf of the Infectious**, v., 27, 2015.

SCHALLENBERGER, M. A. et al. The Psychotrimine Natural Products have Antibacterial Activity Against Gram-Positive Bacteria and Act Via Membrane Disruption. **Journal Antimicrobial**, Tokyo, v. 63, n.11, p. 685-687, 2010.
STOJKOVIC, D. et al Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. **Food Chemistry**, Barking, v.128, p.1017–1022, 2011.

WANG, H.; PENG, D.; XIE, J. Ginseng leaf-stem: bioactive constituents and pharmacological Functions. **Chinese Medicine**, London, v 4, 20, 2009.

ZWICK M. E. et al. Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. **Genome Research**, New York, v. 22, p. 1512–1524, 2012.

CAPÍTULO 3 Potencial tolerância biocida e impacto sobre a resposta adaptativa à concentrações subletais de soluções de três terpenóides e dois fenilpropanóides, em cepas de *Bacillus cereus*

RESUMO

A rápida evolução de certos microrganismos permite sua adaptação em ambientes e condições distintas, desenvolvendo tolerância, e até mesmo resistência ao aumento de um ou mais estresses. O uso de compostos obtidos a partir de produtos naturais tem sido estudado como possível alternativa ao controle de crescimento e aquisição de resistência por esses microrganismos. Esse trabalho visou verificar a adesão e atividade antibiofilme de cepas *B.cereus*; verificar ação sanificante frente aos compostos α -terpineol, cinamaldeído, eugenol, citral e timol e; posteriormente, estudar a adaptação e a adaptação cruzada à concentrações subletais de dois compostos mais efetivos, em células sésseis de cepas de *B. cereus*. As cepas de *B. cereus* apresentaram adesão e atividade antibiofilme frente aos compostos testados. As soluções sanificantes apresentaram atividade bactericida contra células planctônicas e sésseis, porém, foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,005$). As soluções de citral e cinamaldeído foram as mais eficazes para todas as cepas testadas. Os resultados obtidos demonstraram que *B. cereus* apresentou adaptação e adaptação cruzada ao citral e cinamaldeído. O presente trabalho sugere estudos futuros ainda mais abrangentes quanto à potencialidade antimicrobiana destes compostos

Palavras- chave: Antimicrobianos naturais. Compostos bioativos. Patógeno alimentar.

ABSTRACT

Some microorganisms have rapidly evolved and their adaptation in different environments and conditions, developing tolerance and even resistance to the increase of one or more stresses. The use of compounds obtained from natural products have been studied as an alternative to growth control and acquisition of resistance to these microorganisms. This study aimed to verify adherence and antibiofilm activity of *B. cereus* strains; verify action sanitizing front of α -terpineol compounds cinnamaldehyde, eugenol, citral and thymol, and then study the adaptation and cross-adaptation to sublethal concentrations of the two most effective compounds in sessile cells of *B. cereus* strains. The strains of *B. cereus* showed adhesion and antibiofilm activity against the tested compounds. The sanitizing solutions showed bactericidal activity against planktonic and sessile cells, however significant differences were found between concentrations ($p < 0.005$). The solution citral and cinnamaldehyde were the most effective for all strains tested. The results showed that *B. cereus* introduced adaptation and cross-adaptation to citral and cinnamaldehyde. This study suggests future studies even more comprehensive as the antimicrobial potential of these compounds.

Key-words: Natural antimicrobial. Bioactive compounds. Food pathogen.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma bactéria formadora de endósporos comumente isolada de produtos alimentícios, podendo causar toxinfecções alimentares, síndrome emética ou diarreica (RAHIMI et al., 2013; RHEE et al., 2015). Além disso, a literatura sugere três aspectos importantes resultantes da presença de *B. cereus* na indústria alimentar, o que torna seu controle difícil. Em primeiro lugar, é pouco provável conseguir evitar a contaminação total, uma vez que esta bactéria (sob a forma de células vegetativas e endósporos) é amplamente difundida no ambiente natural, em particular, no solo. Em segundo lugar, tem a capacidade de adesão e formação de biofilme em diferentes superfícies, e a temperatura de processamento da maioria dos alimentos é geralmente insuficiente para destruir seus endósporos, que permanecerão viáveis no produto e nas superfícies de processamento (GRANUM, 2001; ARAÚJO et al., 2009; JAN et al., 2011; PADEGAR; SINGH, 2012).

Ao longo da cadeia alimentar, superfícies industriais molhadas, com falhas nos procedimentos de limpeza e higienização, podem proporcionar substrato para o desenvolvimento e persistência de um ecossistema dinâmico espacialmente organizado, chamado biofilme, que pode conter microrganismos patogênicos (WINKELSTROTTER et al., 2013).

Os microrganismos, quando em biofilme, alteraram a sua fisiologia, tornando-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos, antibióticos e desinfetantes disponíveis no comércio, por conseguinte, desempenham papel-chave na capacidade dos microrganismos patogênicos persistirem na cadeia alimentar (VERRAES et al., 2013).

Antimicrobianos naturais, como óleos essenciais e seus componentes, são alternativa aos antimicrobianos tradicionais, e têm a vantagem de que as suas origens naturais não levam à rejeição do consumidor. No entanto, antes da

indústria utilizá-los em grande escala, é necessário conhecer seus efeitos sobre microrganismos.

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm sido relatadas em vários estudos (BAKKALI, et al., 2008; BAJPAI; BAEK; KANG, et al., 2012). Em muitos casos, a atividade resulta de complexa interação entre as diferentes classes de compostos, tais como fenóis, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres, éteres ou hidrocarbonetos, encontrados nos óleos essenciais (BAJPAI; BAEK; KANG, et al., 2012). Porém, em alguns casos, a bioatividade dos óleos essenciais está intimamente relacionada à atividade de um composto específico nele presente (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Neste trabalho, foi avaliada a ação sanificante dos componentes α -terpineol, cinamaldeído, eugenol, citral e timol, sobre células planctônicas e séssil, de cepas de *Bacillus cereus*; e o efeito da exposição das células bacterianas às concentrações subletais, dos compostos que apresentaram maior atividade antimicrobiana.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Componentes majoritários

Os componentes α -terpineol (pureza = 90%), cinnamaldeído (pureza = 93%), eugenol (pureza = 99%), citral (pureza = 95%), timol (pureza = 99,5%), foram adquiridos da Sigma – Aldrich. Grau de pureza fornecido pela Sigma – Aldrich.

2.2 Microrganismos e padronização dos inóculos

Foram utilizadas as cepas de *Bacillus cereus* ATCC 14579, *B. cereus* ATCC 11778, *B. cereus* CCT 2897 e *B. cereus* CCT 7453. Durante todo o experimento, as cepas foram estocadas em meio de congelamento (15 mL glicerol; 0,5 g peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura e 0,5 g NaCl; 100 mL de água destilada, pH 7,2-7,4). A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. A cepa foi reativada pela transferência de alíquotas da cultura estoque, que foram transferidas para caldo Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Índia), com auxílio de alça de repicagem. Foram realizados três repiques consecutivos, com incubação a 32°C por 24 horas. Após a terceira repicagem, a cultura foi estriada em Agar Triptona de Soja (TSA) (Himedia®, Índia) e incubada a 32 °C por 24 horas. As colônias formadas na superfície de TSA foram removidas e transferidas para 50 mL de caldo BHI, e incubadas a 32 °C. O crescimento foi monitorado por leituras periódicas em espectrofotômetro (CARY Varian Inc.), (D.O 600 nm) e plaqueamento em superfície em TSA, e incubação a 32 °C por 24h. A cultura foi padronizada em 10^8 UFC.mL⁻¹.

2.3 Determinação das concentrações mínimas inibitórias e bactericidas dos componentes sobre células planctônicas

Os inóculos utilizados foram obtidos a partir da inoculação das culturas estoque em 50 mL de caldo BHI, e incubados a 32 °C por 24 h. Após esse período, as culturas foram padronizadas em 10^5 UFC.mL⁻¹.

A Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos componentes majoritários α -terpineol, cinamaldeído, eugenol, citral e timol, foi determinada utilizando-se a técnica da microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (M7-A6) (NCCLS,2003), com adaptações.

Para tanto, soluções antimicrobianas contendo caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e de compostos majoritários, foram preparadas nas concentrações de 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6; 0,3; e 0,0 μ L. mL⁻¹. Alíquotas de 150 μ L dessas soluções foram adicionadas nas cavidades.

Alíquotas de 10 μ L das culturas padronizadas foram adicionadas às soluções antimicrobianas dispensadas nas cavidades das microplacas, que foram tampadas e incubadas a 32 °C por 24h. A CMI foi determinada por avaliação visual do crescimento bacteriano pela turvação do meio. A CMI foi definida como a menor concentração de compostos, que resultou na ausência de crescimento visível em caldo.

A concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada verificando-se o crescimento celular em placas contendo TSA. Como controle positivo foi utilizado caldo BHI inoculado com *B. cereus*, sem adição de componente majoritário. Para o controle negativo utilizou-se caldo BHI acrescido de 0,5% de Tween 80 e componente majoritário. A CMB foi definida como a menor concentração dos compostos, que resultou na ausência de crescimento de *B.*

cereus em placa. Todo o experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

2.4 Formação de biofilme por cepas de *Bacillus cereus*

As cepas de *B. cereus* foram avaliadas quanto à capacidade de formar biofilme em microplacas de poliestireno e cupons de aço inoxidável.

2.4.1 Classificação da capacidade de formação de biofilme de cepas de *B. cereus*

Os biofilmes de *B. cereus* foram formados nas cavidades das microplacas, pela inoculação de alíquotas de 50 µL de cultura padronizada em 150 µL de BHI, e incubados a 32 °C por 48 h. Para controle negativo foi adicionado nas cavidades, 200 µL de BHI. Após esse período, a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes consecutivas com solução salina (0,85% m/v), para remoção das células não aderidas. Em seguida, 200 µL de solução de cristal violeta (0,1% m/v) foi adicionado em cada cavidade. Após 10 minutos de contato, a solução de cristal violeta foi removida, e os poços foram lavados três vezes com solução salina (0,85% m/v). Os biofilmes visíveis como anéis corados nas paredes das cavidades, foram desprendidos após a secagem das placas ao ar, pela adição de 200 µL de etanol a 95% (v/v). Após 10 minutos de contato, o conteúdo das cavidades foi homogeneizado e transferido para nova microplaca. A concentração de cristal violeta na fase líquida foi avaliada, medindo-se a absorbância a 600nm em leitor de microplaca (adaptado de MERRITT et al., 2005).

A classificação que segue foi utilizada para determinar a capacidade de formação de biofilme: não-formadoras de biofilme ($DOA \leq Docn$); fracamente

formadora de biofilme ($\text{Doa} < 2 \times \text{Doa}_{\text{Docn}}$); moderadamente formadora de biofilme ($2 \times \text{Doa}_{\text{Docn}} < \text{Doa} < 4 \times \text{Doa}_{\text{Docn}}$) e; fortemente formadora de biofilme ($4 \times \text{Doa}_{\text{Docn}} < \text{Doa}$). Doa é a densidade óptica do biofilme e Doa_{Docn} é a densidade óptica do controle de crescimento negativo (STEPANOVIĆ et al., 2000). Os valores finais foram obtidos pelas médias aritméticas das absorbâncias lidas, sendo realizadas 8 replicatas.

2.4.2 Formação de biofilmes de cepas de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável

Cupons de aço inoxidável AISI 304 (#4) (1x8x18mm) foram previamente higienizados e esterilizados de acordo com Rossoni e Gaylard (2000), citado por Oliveira et al. (2010). Duas cepas com maior capacidade de adesão, determinadas anteriormente, foram utilizadas para o teste de adesão sobre aço inoxidável: *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* CCT 2897.

Os cupons foram dispostos em placas de Petri (120 mm de diâmetro) contendo 60 mL de BHI. Em seguida, os inóculos padronizados foram acrescentados na concentração final de $7 \log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. A incubação foi conduzida a 32 °C, por 72 h, em condições estáticas. Durante esse período, a cada 12 horas, a adesão foi avaliada pela retirada de cupons do meio de cultivo, que foram lavados três vezes com solução salina para remoção das células não aderidas, imersos em água peptonada 0,1% (m/v) contida em tubo de ensaio, e submetidos a agitação por 2 minutos em agitador tipo vortex, para remoção das células sésseis. Alíquotas de 10 µL das diluições adequadas foram plaqueadas em TSA, empregando-se a técnica de microgota, e incubadas a 32 °C por 12 h.

2.5 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários sobre biofilmes de cepas de *Bacillus cereus*

Os cupons contendo os biofilmes de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* CCT 2897 foram imersos em solução salina acrescida de 0,5% de Tween 80 e dos componentes majoritários nas concentrações de 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6; e 0,3 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após 20 minutos de contato à temperatura ambiente e condições estáticas, os cupons foram lavados três vezes com solução salina, para remoção dos compostos residuais. Em seguida, foram transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (m/v) e submetidos a agitação por 2 minutos em agitador tipo vortex, para remoção das células sésseis. Alíquotas de 10 μL das diluições adequadas foram plaqueadas em TSA, empregando-se a técnica de microgota, e incubadas a 32 °C por 12 h.

A concentração mínima bactericida (CMBB) dos componentes majoritários sobre os biofilmes de *B. cereus*, foi definida como a menor concentração de antimicrobiano capaz de reduzir a números indetectáveis em TSA, as células destacadas do biofilme.

2.6 Formação de biofilme por *Bacillus cereus* em condições de estresse subletal

A influência do estresse subletal, causada pela presença dos compostos α - terpineol, cinamaldeído, eugenol, citral e timol na formação de biofilme por *B. cereus* foi avaliada.

Biofilmes de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* CCT 2897 em aço inoxidável, foram formados em presença de concentrações subletais dos compostos majoritários, observando-se as CMBB para os microrganismos. Os compostos na concentração de 1/4 CMBB impediram a formação dos biofilmes,

assim, testes foram realizados para determinar a concentração máxima subletal (CMS), que permite o crescimento do microrganismo (Di PASQUA et al., 2010). Definiu-se então, $\frac{1}{4}$ da CMB das células planctônicas, como a CMS para ser utilizada.

Os cupons de aço inoxidável foram dispostos em placas de Petri (120 mm de diâmetro) contendo 60 mL de BHI, adicionados de 0,5% de Tween 80 e CMS ($\frac{1}{4}$ MCB) dos compostos (Tabela 1).

Em seguida, os inóculos padronizados foram adicionados na concentração final de $7 \log \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ e as placas incubadas em condições estáticas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas. O biofilme controle foi formado sob as mesmas condições, entretanto, sem adição dos compostos.

Após as 48h de incubação, os cupons foram lavados três vezes com solução salina 0,85% (m/v) para remoção das células não aderidas, transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (m/v), e submetidos a agitação por 2 minutos em agitador tipo vortex, para remoção das células sésseis. Alíquotas de $10 \mu\text{L}$ das diluições adequadas foram plaqueadas em TSA, empregando-se a técnica de microgota, e incubadas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h.

Tabela 1 Concentração subletal dos componentes majoritários usados no cultivo de *Bacillus cereus* para formação de biofilme em cupons de aço inoxidável

Compostos	Concentração subletal ($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	ATCC 14579	CCT 2897
α -terpineol	1,2	1,2
Cinamaldeído	0,3	0,15
Eugenol	0,6	1,2
Cítral	0,15	0,15
Timol	0,6	0,15
Controle	0	0

2.7 Determinação da concentração mínima bactericida dos componentes majoritários sobre biofilmes adaptados

Após formação de biofilmes de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* CCT 2897 sobre cupons de aço inoxidável por 48h, estes foram retirados das placas e expostos por 20 minutos a soluções contendo solução salina, 0,5% de Tween 80, e componentes majoritários nas concentrações de $\frac{1}{4}$ CMB. Os cupons foram removidos e lavados três vezes com solução salina 0,85% (m/v), para remover a solução residual. Em seguida os cupons foram novamente dispostos em placas de Petri (120 mm de diâmetro) contendo 60 mL de BHI, e incubados a 32 °C por 12 h em condições estáticas.

Os cupons contendo os biofilmes adaptados foram transferidos para tubos de ensaio contendo água destilada, 0,5% de Tween 80 e os mesmos componentes majoritários, aos quais foram expostos anteriormente em concentrações subletais, nas concentrações de 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,2; 0,6; e 0,3 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$. Após 20 minutos de contato à temperatura ambiente, e condições estáticas, os cupons foram lavados três vezes com solução salina, para remoção

das células não aderidas, transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (m/v) e submetidos a agitação por 2 minutos em agitador tipo vortex, para remoção das células sésseis. Alíquotas de 10 µL das diluições adequadas foram plaqueadas em TSA, empregando a técnica de microgota, e incubadas a 32 °C por 12 h.

2.8 Determinação da concentração mínima bactericida do citral e cinamaldeído sobre biofilmes adaptados

Com base no teste anterior, foram selecionados o citral e o cinamaldeído, compostos com a atividade antimicrobiana mais elevada dentre todos, para a avaliação da capacidade de adaptação cruzada do biofilme.

Os cupons foram dispostos em placas de Petri (120 mm de diâmetro) contendo 60 mL de BHI e incubados a 32 °C por 48 h em condições estáticas. Durante esse período, a cada 12 horas, avaliou-se a formação de biofilme. Após as 48h de incubação, os cupons foram removidos, lavados três vezes com solução salina para remoção das células não aderidas, e sanificados em solução de água destilada, 0,5% de Tween 80 e concentrações subletais ($\frac{1}{4}$ MCB) de citral e cinamaldeído, por 20 minutos em temperatura ambiente, e condições estáticas. Após exposição ao estresse subletal, os cupons foram novamente dispostos em placas de Petri (120 mm de diâmetro), contendo 60 mL de BHI e incubados a 32 °C por 12 h em condições estáticas.

Após esse período, os cupons foram submetidos à sanitização. Foram removidos e lavados três vezes com solução salina, para retirar as células não aderidas. Em seguida, os cupons foram sanificados em solução de água destilada contendo 0,5% (v/v) de Tween 80, e do componente puro em diferentes concentrações (Tabela 2).

Tabela 2 Composição das soluções sanificantes usadas no tratamento dos biofilmes de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável

Soluções	Composição		
	Água destilada com 0,5% Tween 80 (μL. mL)	Cinamaldeído (μL. mL)	Citral (μL. mL)
SC	100,00	0,00	0,00
SCIN 1	99,70	0,3	0,00
SCIN 2	99,85	0,15	0,00
SCIT 1	99,85	0,00	0,15
SCIT 2	99,85	0,00	0,15

SC (solução controle). Scin 1 (solução com concentração subletal de cinamaldeído, preparado para cepa ATCC 14579). Scin 2 (solução com concentração subletal de cinamaldeído, preparado para cepa CCT 2897). SCIT 1 (solução com concentração subletal de citral, preparado para cepa ATCC 14579). SCIT 2 (solução com concentração subletal de citral, preparado para cepa CCT 2897).

O tratamento foi mantido por 20 minutos em temperatura ambiente e condições estáticas. Os cupons foram lavados três vezes numa solução salina para remover os compostos residuais. Em seguida foram imersos em tubos de ensaio contendo água peptonada a 0,1% (m/v), e agitados por 2 minutos em agitador tipo vortex, para remoção das células sésseis. Alíquotas de 10 μL das diluições adequadas foram plaqueadas em TSA, empregando a técnica de microgota, e incubadas a 32 °C por 12 h.

2.9 Análise estatística

O experimento foi conduzido em dois delineamentos.

2.9.1 Desenvolvimento do biofilme

Delineamento inteiramente casual em arranjo fatorial 2 x 5 (estirpes x tempos de formação), em três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, análise de regressão e teste de média (Skott-Knott).

2.9.2 Estudo do comportamento das células após a exposição subletal

Delineamento inteiramente casual em arranjo fatorial 3 x 3 (soluções sanificantes x condições de formação), em três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste (Skott-Knott). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antimicrobiana em células planctônicas

As Atividades antimicrobianas das soluções dos compostos puros α -terpineol, cinamaldeído, eugenol, citral e timol, em células planctônicas de cepas de *Bacillus cereus*, são apresentadas na Tabela 3. Os resultados apresentados mostram que as soluções possuem atividade antibacteriana em diferentes concentrações. A maior concentração mínima bactericida encontrada foi de $5,0 \mu\text{L. mL}^{-1}$ apresentada pelos compostos α -terpineol e eugenol.

A solução a base de citral foi mais eficaz contra células planctônicas de todas as cepas testadas, apresentando concentração mínima bactericida de $0,6 \mu\text{L/ mL}^{-1}$.

Tabela 3 Concentração mínima bactericida de citral (CIT), timol (TIM), α -terpineol(TER), cinamaldeído(CIN), eugenol(EUG) sobre cepas de *Bacillus cereus*

Cepas	Componentes ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)				
	CIT	TIM	TER	CIN	EUG
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0,6	2,5	5,0	1,2	2,5
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,6	2,5	5,0	0,6	5,0
<i>Bacillus cereus</i> CCT 7453	0,6	2,5	2,5	1,2	2,5
<i>Bacillus cereus</i> CCT 2897	0,6	0,6	5,0	0,6	5,0

A diferença entre a atividade antibacteriana dos compostos puros pode ser atribuída às composições químicas, à sua configuração estrutural, e à natureza dos mesmos (CHANG; CHEN; CHANG, 2001).

Em geral, o que se encontra na literatura, é que os compostos fenilpropanóides são mais eficazes contra microrganismos (DI PASCA et al., 2010; OUSSALAH et al. 2007). Porém, nesse trabalho, o eugenol, um fenilpropanóides, apresentou resultados inferiores aos compostos terpenóides utilizados.

Os terpenóides podem perturbar as células modulando a fluidez da membrana, aumentando a permeabilidade ou solubilizando as biomembranas (WINK, 2008). Neste trabalho, observou-se a importância da lipofilicidade de terpenos para a atividade do composto, evidenciado pela maior ação do citral.

3.2 Formação de biofilme e sua classificação

As quatro cepas utilizadas apresentaram capacidade de aderir e formar biofilme. As cepas de *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* CCT 2897 foram classificadas como moderados formadores de biofilme. As cepas de *B. cereus* ATCC 11778 e *B. cereus* CCT 7453 foram classificadas como fracamente capazes de formar biofilme.

A fim de confirmar que a diferença na formação de biofilme entre as quatro cepas, não está relacionada à diferença da taxa de crescimento entre as linhagens, avaliou-se a taxa de crescimento, encontrando-se aproximadamente 0,88 gerações por hora, em todas as cepas (curva de crescimento não mostrada).

A formação de biofilme de *B. cereus* foi inicialmente testada em placas de poliestireno. Os resultados obtidos foram consistentes com os encontrados na literatura. No teste de adesão em poliestireno, as cepas classificadas como fracamente capazes de formar biofilme, não foram mais utilizadas nesse trabalho.

As cepas classificadas como moderadamente formadoras de biofilme em poliestireno, foram testadas para formação de biofilme em aço inoxidável (Figura 1).

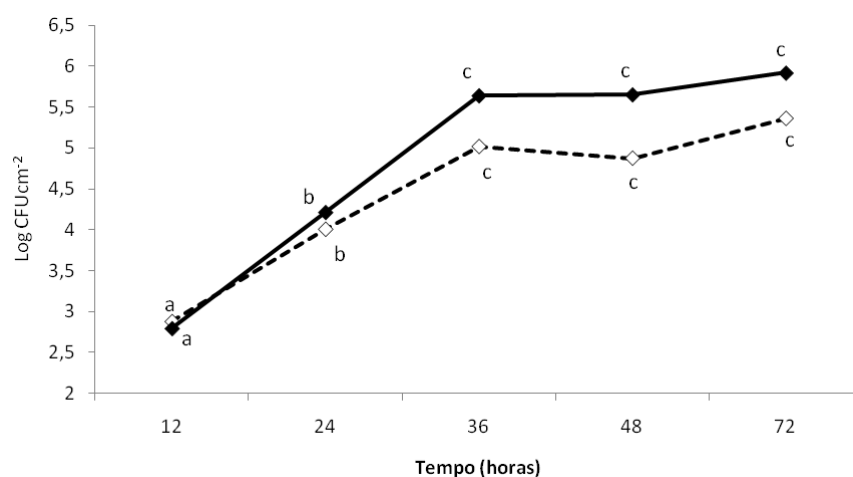


Figura 1 Formação de biofilme por duas cepas de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável

Legenda: (◇) Médias de adesão da cepa ATCC 14579, (♦) Médias de adesão da cepa CCT 2897. Em cada estágio de formação de biofilme, a mesma letra não difere pelo teste Skott-Knott a 5% probabilidade.

As estirpes de *B. cereus* avaliadas foram capazes de aderir e formar biofilmes na superfície de aço inoxidável. De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a capacidade de formação de biofilme das duas cepas testadas. Neste estudo, foi observado que as duas cepas de *B. cereus* (ATTC 14579 e CCTT 2897) diferiram entre si na capacidade de formação de biofilme ao longo do tempo. Após 12 e 24 horas de cultivo, as duas cepas apresentaram comportamento de adesão semelhante, não diferindo significativamente ($p < 0,05$) na contagem do número de células aderidas. A

diferença na adesão ocorreu após 36 horas de cultivo, e permaneceu por todo o período avaliado.

Após 36 horas de cultivo, houve estabilização do número de células aderidas para as duas cepas avaliadas, não ocorrendo diferença significativa ($p < 0.05$) na adesão, após 36, 48 e 72 horas de cultivo da mesma cepa. Com 72 horas de cultivo, *B. cereus* ATCC 1459 apresentou adesão de 5,36 log. UFC. cm⁻² e *B. cereus* CCT 2897 de 5,92 log. UFC. cm⁻². Resultados semelhantes foram encontrados por Bernardes et al. (2010), onde a adesão foi avaliada durante 10 dias, atingindo o 4,43 log. UFC cm⁻².

Após a estabilização do biofilme, as células sésseis podem se desprender e contaminar o substrato em circulação. Isso mostra o risco que essas comunidades microbianas representam para a qualidade dos alimentos e segurança dos consumidores (OLIVEIRA et al., 2010).

3.3 Formação de biofilme por *Bacillus cereus* em condições de estresse subletal

As estirpes de *B. cereus* mostraram-se capazes de formar biofilme na presença de compostos puros em concentração subletal (Tabela 4). O tempo de estabilização do número de células aderidas para as cepas *B. cereus* foi de 36 horas (figura 1), por isso, definiu-se o tempo de avaliação de formação de biofilmes em presença dos compostos após 48 horas de cultivo.

Ambas as cepas cultivadas em presença de compostos puros em concentrações subletais, foram capazes de se aderirem e formarem biofilme sobre aço inoxidável, porém, a adesão foi menor em comparação com o controle (Tabela 4).

Tabela 4 Biofilme (B) de *Bacillus cereus* formado sob estresse subletal promovido por citral (CIT), cinamaldeído(CIN), eugenol(EUG), timol (TIM), α -terpineol(TER) e controle (C)

Condições de formação de biofilme	Log UFC cm ⁻²		Médias
	ATCC 14579	CCT 2897	
BC	5,05 ±0.23 Aa	5,92 ±0.08 Ab	5,48±0.61
BCIT	3,53 ±0.52 Ba	3,69 ±0.24 Bb	3,61±0.11
BCIN	3,35 ±0.17 Ca	3,45 ±0.29 Cb	3,40±0.07
BEUG	3,17 ±0.08 Da	3,36 ±0.49 Db	3,27±0.13
BTIM	3,16 ±0.45 Da	3,21 ±0.18 Ea	3,19±0.04
BTER	3,11 ±0.29 Da	3,17 ±0.32 Ea	3,14±0.04
Médias	3,56±0.68	3,8±0.296	

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. As letras maiúsculas na mesma coluna e na mesma linha não diferem pelo teste Scott-Knott a 5% probabilidade.

Verificou-se que houve diferença significativa entre a capacidade de formação de biofilme das duas cepas utilizadas na presença dos compostos, bem como no controle ($p < 0,05$), exceto na presença do composto timol e α -terpineol.

A maior aderência celular ocorreu na presença dos compostos cinamaldeído e citral, sugerindo possível indução da resistência por esses compostos.

Para Ceri et al., (2001), células organizadas começam a ter vantagens em relação às células em seu estado planctônico, por terem melhores condições de sobrevivência e resistência a agentes antimicrobianos.

3.4 Concentração mínima bactericida em biofilmes

Na Tabela 5, observa-se o comportamento dos biofilmes formados por *B. cereus* ATCC 14579 e *B. cereus* CCT2897, crescidos em concentrações subletais. E em seguida, avaliou-se a concentração mínima bactericida para o

biofilme controle (biofilme) e para o biofilme submetido ao crescimento com os compostos puros (adaptação).

Os resultados obtidos mostram que as cepas de *B. cereus* adaptaram-se às concentrações subletais dos compostos puros, pois foram encontradas diferenças na concentração mínima bactericida entre as condições de adaptação e biofilme (Tabela 5).

Tabela 5 Concentração mínima inibitória de compostos α -terpineol, cinnamaldeído, eugenol, citral, timol para biofilmes de *Bacillus cereus* ATCC 14579 e CCT 2897, crescidos expostos à concentração subletal dos mesmos compostos

<i>Bacillus cereus</i>	Componentes ($\mu\text{L. mL}^{-1}$)				
	α -terpineol	Cinnamaldeído	Eugenol	Citral	Timol
Não adaptado					
ATCC 14579	5	2,5	5,0	2,5	5,0
CCT 2897	5	2,5	10	5	10
Adaptado					
ATCC 14579	20	10	40	10	20
CCT 2897	5	10	40	10	20

É possível observar que foram necessárias concentrações muito maiores de soluções para inibir o desenvolvimento dos biofilmes formados por cepas de *B. cereus*, quando submetidas ao crescimento em concentrações subletais dos compostos, evidenciando a adaptação e o aumento da tolerância dos microrganismos aos antimicrobianos, quando expostos a condições não ideais para a sua eliminação.

Os resultados também mostram as variações no que diz respeito às concentrações que resultaram na inibição de crescimento encontrados para as células planctônicas e sésseis (Tabela 3 e 5). As células planctônicas

apresentaram maior sensibilidade aos compostos puros que as células sésseis. Isso pode ser explicado pelo comportamento diferente das células planctônicas e sésseis.

Resultados encontrados na literatura corroboram com esse trabalho, em que as células sésseis foram mais resistentes aos produtos antibacterianos naturais do que as células planctônicas, e apenas as concentrações mais elevadas de alguns compostos puros reduziram a viabilidade das bactérias presentes em biofilmes (LIU; YANG, 2012).

A exposição constante do biofilme bacteriano, em concentrações subletais de sanitizantes, durante os procedimentos de limpeza, pode ativar os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse, fazendo com que as bactérias sobrevivam em condições ambientais, antes hostis. Resultados encontrados em estudo com diversas cepas de *Bacillus cereus*, mostram que estas apresentavam alta resistência aos agentes antimicrobianos tradicionais, quando expostas por períodos prolongados aos mesmos (MERZOUGUI, et al., 2014).

3.5 Efeito de exposição do biofilme à concentrações subletais de antimicrobianos e resistência cruzada

A resposta adaptativa à exposição a concentrações subletais foi avaliada (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 Valores de log-redução dos biofilmes (B) formados por *Bacillus cereus* ATCC 14579 após 48 horas (2 dias) obtidos após tratamento com soluções (S) contendo concentrações subletais de cinamaldeído (CIN) e citral (CIT) e solução controle (SC)

Soluções	Condições de formação					
	BC		BCIN		BCIT	
	Log-reduction	%	Log-reduction	%	Log-reduction	%
SC	0.58±0.25aA	12,89	0.28±0.08aA	5.61	0.35±0.39aA	9.72
SCIT	1.62±0.44bB	38.61	1.95±1.50bB	52.09	2.33±0.41bB	56.42
SCIN	2.28±0.18bB	55,21	2.26±1.36bB	55.19	2.90±1.03bC	57.00

Resultados expressos pela média \pm o desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. BC (biofilme controle), BCIN (biofilme exposto a concentrações subletais de cinamaldeído durante a sua formação), BCIT (biofilme exposto a concentrações subletais de citral durante a sua formação).

Os resultados obtidos para as diferentes cepas de *B. cereus*, mostraram que a sensibilidade do microrganismo, após a exposição a doses subletais de CIN e CIT, é dependente da estirpe e dos óleos essenciais utilizados.

A cepa de *B. cereus* ATCC14579, crescidos em concentrações subletais de cinamaldeído e citral, não apresentaram diferença significativa para eliminação dos biofilmes com a solução de cinamaldeído e citral ($p < 0,05$). As soluções dos compostos diferiram significativamente da solução controle ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 7 Valores de log-redução dos biofilmes (B) formados por *Bacillus cereus* CCT2897 após 48 horas (2 dias) obtidos após tratamento com soluções contendo concentrações subletais de cinamaldeído (CIN) e citral (CIT) e solução controle (SC)

Soluções	Condições de formação					
	BC		BCIN		BCIT	
	Log-reduction	%	Log-reduction	%	Log-reduction	%
SC	0.58±0.25aA	12,19	0.18±0.08aA	3,61	0.35±0.39aA	8.42
SCIT	0,95±0.44aA	14.61	0,62±1.50bB	13,09	0.63±0.41bB	13.22
SCIN	0.78±0.18aA	13,98	0.56±1.36bB	11,89	0.90±1.03bC	14,43

Resultados expressos pela média \pm o desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. BC (biofilme controle), BCIN (biofilme exposto a concentrações subletais de cinamaldeído durante a sua formação), BCIT (biofilme exposto a concentrações subletais de citral durante a sua formação).

A cepa de *B. cereus* CCT 2897 crescidos em concentrações subletais de cinamaldeído e citral, apresentou diferença significativa para eliminação dos biofilmes com a solução citral, e não apresentou diferença significativa para a solução de cinamaldeído ($p < 0,05$). As soluções dos compostos diferiram significativamente da solução controle ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Os biofilmes crescidos em presença de cinamaldeído apresentaram Log da redução semelhante para solução de citral, cinamaldeído e solução controle. Isso mostra que a exposição frequente a concentrações subletais de CIN ou CIT, afetou negativamente a eliminação dos biofilmes das cepas de *B. cereus* estudadas.

Muitos microrganismos são capazes de desenvolverem resposta adaptativa ao estresse subletal, o que lhes permite tolerar e sobreviver à exposição subsequente a níveis letais do mesmo estresse, ou até mesmo a um

tipo diferente de estresse (UTLEE et al, 2000). A maior resposta adaptativa das células é manter a fluidez da membrana com um valor constante, independente das condições ambientais no momento.

Os óleos essenciais são lipofílicos e têm capacidade de penetrar na membrana citoplasmática e alterar a sua permeabilidade. Essa alteração leva à perda de íons, alterações na bomba de prótons e perdas de ATP, coagulação citoplasmática e quebra de macromoléculas (SOLOMAKOS et al. 2008).

As condições que os microrganismos enfrentam durante o processamento de sanitização, podem levar ao desenvolvimento de respostas adaptativas, e desenvolvimento de tolerância após a exposição a fatores subletais de estresse, capazes de provocar danos às células microbianas (LUZ et al., 2012). É bem conhecido que a exposição a condições subletais de substâncias antimicrobianas, pode resultar no desenvolvimento de aumento da tolerância aos mesmos (homólogos), ou a agente de estresse de tolerância cruzada (heterólogos) (ALVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2008).

A adaptação de *Bacillus cereus* ao citral e cinamaldeído pode ter ocorrido por diversos fatores. Estudo realizado com *Bacillus cereus*, em presença de carvacrol, apresentou diminuição da fluidez da membrana citoplasmática, devido a alterações nas estruturas da mesma. Além disso, o composto, embora tenha alterado a composição da membrana, não foi metabolizado (UTLEE et al., 2000).

Apesar de aparentemente interessante do ponto de vista científico, este fato deve ser visto de maneira cuidadosa, pois a possível adaptação, e possível aquisição de resistência por parte dos microrganismos em questão, podem apresentar sérios problemas futuros.

Isso demonstra o risco que a tomada de decisão baseada na análise de apenas uma cepa de microrganismos, ou de apenas um composto sanificante, pode levar.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos são importantes dentro de uma nova linha de pesquisa a ser seguida. Mais estudos para elucidar os mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência, ou da suscetibilidade bacteriana, devem ser realizados, bem como ensaios envolvendo cepas persistentes ou isoladas, diretamente de indústrias de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, p. 1217-1227, 2012.
- ALVAREZ-ORDONEZ, A. et al. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.123p. 212-219, 2008.
- ARAÚJO, E. A. et al. Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. **Alimentos e Nutrição**, Campinas v. 20, p. 491-497, 2009.
- AZNAR, A. et al. Antimicrobial activity of nisin, thymol, carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*. **Food Science and Technology International**, Ibaraki, v.21, p. 72-79, 2015.
- BAJPAI V. K.; BAEK K. H.; KANG S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, Essex, v. 45, p.722–734, 2012.
- BAKKALI F. et al. Biological effects of essential oils– a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46, p. 446–475, 2008.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oil in combination and Their Antimicrobial properties. **Molecules**. Basel, v. 17, p. 3989-4006, 2012.
- CHANG, S. T.; CHEN, P. F., CHANG, S. C. Antibactery activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal Ethnopharmacol**, Limerick, v. 77, p. 123-127, 2001.
- DI PASCA, R. et al. Changes in the proteome of *Salonella entérica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**. Weinheim, v. 10, p 1040-1049, 2010.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 2 ed. Washington: ASM Press, 2001, p. 327–336.

JAN, S. et al. Biodiversity of psychrotrophic bacteria of the *Bacillus cereus* group collected on farm and in egg product industry. **Food Microbiol**, London, v.28, p.261-265, 2011.

LUZ, I. S. et al. Evidence for no acquisition of tolerance in *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 78, p.5021–5024, 2012.

KLEIN, G.; RUBEN, C.; UPMANN, M. Antimicrobial activity of essential oil components against potential food spoilage microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 67, p. 200–208, 2013.

LIU, T. T.; YANG, T.-S. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.156, p. 68–75, 2012.

MERZOUGUI, S. et al. Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, p.145-149, 2014.

MILLEZI, F.M. et al. Reduction of *Aeromonas hydrophila* biofilm on stainless steel surface by essential oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.44, p. 73–80, 2013.

MILLEZI, F.M. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J Food Saf.**;v.32, p.351–359, 2012.

CERI, H. et al. The MBEC Assay System: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods Enzymology**, New York, v. 337, p. 377-385, 2001.

OLIVEIRA, M. M. et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 1, p. 97-106, 2010.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. Essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Vurrey, v.1, n.4, p. 549-543, 2010.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. *Cinnamom essential* oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surface. **European Food Research & Technology**, v.234, p. 821-832, 2012.

OUSSALAH, M. S. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Vurrey, v. 18, p.414-420, 2007.

PAGEDAR, A., SINGH, J. Influence of physiological cell stages on biofilm formation by *Bacillus cereus* of dairy origin. **International Dairy Journal**, Barking, v.23, n.1, p.30-35, 2012.

RHEE, C. et al. Epidemiologic Investigation of a Cluster of Neuroinvasive *Bacillus cereus* Infections in 5 Patients With Acute Myelogenous Leukemia. **Oxford University Press on behalf of the Infectious**, v., 27, 2015.

RAHIMI, E. et al. *Bacillus cereus* in infant foods: Prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. **World's Poultry Science Journal**, London, v. 2013, p.1-5, 2013.

SOLOMAKOS, N. et al. The contribution of transcriptomic and proteomics analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Pathogens and Disease**, n. 8, v.8, pl 843-852, 2011.

ULTEE, A. et al. Adaptation of the food-boorne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**. n. 4, v. 174, p. 233- 238, 2000.

VERRAES, C. et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Basel, v.10, p. 2643e2669, 2013.

WINKELSTROTTER, L .K.. et al. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microb. Ecology**, v. 1, p. 12, 2013.