



ALCILENE DE ABREU PEREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE
ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Salmonella* spp.**

**LAVRAS – MG
2014**

ALCILENE DE ABREU PEREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Salmonella* spp.**

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

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Pereira, Alcilene de Abreu.

Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células
planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp / Alcilene de Abreu
Pereira. – Lavras : UFLA, 2014.

94 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Sanitizante. 2. Biofilme. 3. Óleos essenciais. 4.
Salmonella spp. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576

ALCILENE DE ABREU PEREIRA

**ESTUDO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Salmonella* spp.**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2014

Dra. Carolina Valeriano	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi	UFLA
Dr. Allan Kardec Carlos Dias	Faculdade Infórium - BH

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar energia, saúde, perseverança e força para realização desse projeto.

À minha orientadora e amiga Roberta Hilsdorf Piccoli pelos conselhos, paciência, confiança, compreensão, dedicação e orientação durante todos os momentos.

À minha filha Júlia pela presença nos momentos difíceis, paciência com minhas ausências e incentivo.

À minha família e todos que sempre estiveram presentes por todo o incentivo, paciência e atenção.

À Eliane pela colaboração e amizade no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Ao João Paulo por me ajudar com presteza e disponibilidade, essenciais para a conclusão dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos pela amizade, colaboração e ajuda na condução dos experimentos.

À Rose pela paciência e atenção na secretaria do Programa de Pós-Graduação Microbiologia Agrícola.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola: Dra. Rosane Freitas Schawn, Dr. Disney Ribeiro Dias, Dra. Patrícia Gomes Cardoso, Dr. Eduardo Alves, Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista e Dr. Eustáquio Souza Dias pelos ensinamentos e cooperação nas disciplinas cursadas durante o doutorado.

À professora Maria das Graças Cardoso pela oportunidade e orientação no mestrado.

À Maria Isabel Laudares por ter acreditado em mim.

Aos amigos do IFMG pela colaboração e paciência.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade concedida.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro na realização do experimento.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO GERAL

Bactérias do gênero *Salmonella*, responsáveis por inúmeros surtos de toxinfecções alimentares, são capazes de formar biofilmes em várias superfícies utilizadas na indústria de alimentos. A constante exposição desta bactéria a concentrações subletais de sanitizantes tem tornado-a resistente a vários deles. Buscando alternativas para o controle de biofilmes bacterianos, a atividade antimicrobiana e a adaptação das células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium, os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano) e seus compostos timol e carvacrol, foram estudados. As soluções apresentaram atividade bactericida contra as bactérias planctônicas e sésseis, porém foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,05$). Para as células planctônicas *S. Enteritidis*, o carvacrol a 0,25% (v/v) foi mais eficaz, e o biofilme foi mais sensível à solução de orégano a 2,0% (v/v). Também foi observada adaptação da bactéria a concentração subletal para todos os tratamentos ($p < 0,05$). Para *S. Typhimurium*, o tomilho a 0,25% (v/v) foi mais eficaz em células planctônicas e o biofilme foi mais sensível às soluções de tomilho e carvacrol a 2,5% (v/v). Foi observada adaptação às soluções de carvacrol, orégano e timol ($p < 0,05$). A bactéria não se adaptou a concentração subletal de tomilho. Este trabalho confirma o potencial dos metabólitos secundários de vegetais como antibacterianos e possíveis princípios ativos de sanitizantes utilizados em indústrias de alimentos.

Palavras-chaves: Biofilme. Sanitizantes. Tomilho. Orégano. Timol e carvacrol

ABSTRACT GENERAL

Bacteria of the genus *Salmonella*, responsible for many foodborne disease outbreaks, are capable of forming biofilms on various surfaces used in the food industry. The constant exposure of the bacteria to sublethal concentrations of sanitizers have made them resistant to several of them. Seeking alternatives for the control of bacterial biofilms to antimicrobial activity and adaptation of sessile and planktonic cells of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* sorovar Enteritidis and *Salmonella enterica* subspecies *enterica* sorovar Typhimurium, the essential oils of *Thymus vulgaris* (thyme), *Origanum vulgare* (oregano) and thymol and carvacrol their compounds, were studied. The solutions showed bactericidal activity against planktonic and sessile bacteria, but significant differences were found between the concentrations ($p < 0.05$). For planktonic cells *S. Enteritidis*, carvacrol 0.25% (v/v) was more effective and biofilm and was more sensitive to the oregano solution of 2.0% (v/v) adaptation of the bacteria was observed at sublethal concentration for all treatments ($p < 0.05$) and for *S. Typhimurium*, thyme 0.25% (v/v) was more effective in biofilm and planktonic cells were more sensitive to carvacrol and thyme solutions at 2.5% (v/v). Adaptation was observed with solutions of carvacrol, thymol and oregano ($p < 0.05$). The bacteria did not adapt to sublethal concentrations of thyme. This study confirms the potential of secondary metabolites from plants as antibacterial and possible active ingredients of sanitizers used in food industries.

Keywords: Biofilm. Sanitizers. Thyme. Oregano. Thymol and carvacrol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Intoxicação alimentar por <i>Salmonella</i> spp.	14
2.2	Biofilmes: conceito, características estruturais, composição e formação	20
2.3	Biofilmes nas indústrias de alimentos	25
2.4	Metabólitos secundários de vegetais	27
2.5	Óleos essenciais	29
2.5.1	Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais	31
2.5.2	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	33
2.5.3	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	34
	REFERÊNCIAS	36
	CAPÍTULO 2 Estudo da adaptação de <i>Salmonella enterica</i> Enteritidis à concentrações subletais de soluções de óleos essenciais de <i>Thymus vulgaris</i>, <i>Origanum vulgare</i> e seus compostos timol e carvacrol	46
1	INTRODUÇÃO	49
2	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1	Óleos essenciais e compostos majoritários	51
2.2	Microrganismo, estocagem e padronização do inóculo	51
2.3	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) das células planctônicas	52
2.4	Formação de biofilme em microplaca	52
2.5	Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB)	53

2.6	Determinação da adaptação do biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis à concentrações subletais das soluções de óleos essenciais e compostos.....	54
2.6.1	Atividade antibiofilme dos óleos essenciais e seus compostos.....	55
2.6.2	Determinação da concentração mínima bactericida.....	55
2.7	Análises estatísticas.....	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	CAPÍTULO 3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovar Typhimurium.....	71
1	INTRODUÇÃO.....	74
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1	Óleos essenciais e compostos majoritários.....	76
2.2	Microrganismo, estocagem e padronização do inóculo.....	76
2.3	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) das células planctônicas.....	77
2.4	Formação de biofilme em microplaca.....	77
2.5	Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB).....	78
2.6	Determinação da adaptação do biofilme de <i>Salmonella</i> Typhimurium à concentrações subletais das soluções de óleos essenciais e compostos.....	79
2.6.1	Atividade anti-biofilme dos óleos essenciais e seus compostos.....	80
2.6.2	Determinação da concentração mínima bactericida.....	80
2.7	Análises estatísticas.....	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82

4	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

CAPÍTULO 1 Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes microbianos formados por bactérias patogênicas ou deterioradoras têm apresentado expressiva participação nas contaminações de ambientes industriais e hospitalares, acarretando prejuízos e riscos à saúde pública. Dentre os microrganismos de interesse na indústria de alimentos e na saúde, destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella*.

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium, foram identificadas como alguns dos principais causadores de salmoneloses alimentares e caracterizam-se por provocar contaminações devido às deficiências de saneamento básico e ao precário controle de qualidade de algumas indústrias. A capacidade de a *Salmonella* formar biofilmes contribui para o aumento de sua resistência e persistência nos mais diversos ambientes, além de colaborar para sua adaptação a vários tipos de estresse, dentre eles, aos sanitizantes e antibióticos, tornando este gênero mais resistente e difícil de ser eliminado.

As indústrias de alimentos, visando à inocuidade de seus produtos, utilizam agentes antimicrobianos com variados modos de ação, tempo de exposição e composição química. Porém, mesmo se resguardando de todos os infortúnios que essas contaminações podem provocar, os programas de higienização, no que diz respeito aos aspectos microbiológicos, têm se mostrado ineficientes e, muitas vezes, incapazes de remover completamente os biofilmes que se acumulam em superfícies e instalações dos ambientes de processamento de alimentos. Vários fatores contribuem para esse insucesso, dentre eles destaca-se o desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos utilizados, principalmente pela frequente exposição das bactérias em biofilme a concentrações subletais de sanitizantes durante a

higienização. Assim, buscam-se antimicrobianos alternativos àqueles já disponíveis no mercado, pois o controle de biofilmes representa um dos mais persistentes desafios nos ambientes alimentares e hospitalares.

Nesse contexto, os óleos essenciais e seus compostos têm sido muito estudados, uma vez que podem apresentar elevada atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais são sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas e são substâncias voláteis, lipofílicas e líquidas, com características antimicrobianas, antioxidantes, flavorizantes, aromáticas, antissépticas, carminativas, antiespasmódicas e expectorantes (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contêm, entre outros compostos: o timol e o carvacrol, que possuem propriedades bactericidas e fungicidas. Sendo assim, o emprego desses óleos essenciais e compostos representa possibilidade ao controle de biofilmes, pois apresentam elevada atividade antimicrobiana e, em concentrações adequadas, são “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a atividade bactericida das soluções dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano) e seus compostos: timol e carvacrol, sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium, e avaliar a capacidade de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em se adaptar às soluções dos óleos e compostos quando expostas a concentrações subletais dessas substâncias.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Intoxicação alimentar por *Salmonella* spp.

As primeiras bactérias do gênero *Salmonella* foram identificadas em fins do século XIX. A primeira reconhecida como patógeno foi classificada como *Salmonella typhi*, em 1880, por Eberth, encontrada em baço e linfonodos de seres humanos. O seu isolamento e descrição morfológica só foram feitos por Gaffky em 1884 (ZANCAN, 1998). Em 1885, Daniel E. Salmon isolou *Salmonella* em suíno e a nomeou *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis (BHUNIA, 2008). Atualmente, duas espécies de *Salmonella* são reconhecidas: a *Salmonella enterica* e a *S. bongori* (SCHAECHTER et al., 2002).

Salmonella spp. são bactérias da família Enterobacteriaceae, gram-negativas em forma de bastonetes, aeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, catalase-positivas, oxidase-negativas e redutoras de nitratos a nitritos. Possuem capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de 5,3 a 45°C, pH entre 6,6 a 8,2 e atividade de água de 0,94 (JAY, 2005).

O gênero *Salmonella* é vasto, compreendendo mais de 2.300 sorotipos. Os principais antígenos que distinguem suas variedades sorológicas são o somático (O), flagelar (H) e capsular (K). A grande diversidade do gênero decorre da capacidade de esse microrganismo sofrer variação antigênica, da habilidade de criar mosaicos de genes para seus antígenos por meio de recombinação, de alterações no comprimento, de duplicações de genes e de mutações pontuais (SCHAECHTER et al., 2002).

Salmonella spp. é um dos principais agentes patogênicos de origem alimentar. Adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, a salmonelose representa cerca de 10% a 15 % das gastroenterites, sendo as carnes de aves, ovos e produtos cárneos os principais alimentos transmissores da *Salmonella* ao

homem. Sua presença em alimentos é um significativo problema de saúde pública (TUNON et al., 2008).

A contaminação cruzada foi relatada como uma das principais causas de surtos de origem alimentar envolvendo *Salmonella* (TOOD et al., 2009). A responsabilidade por essas contaminações foram atribuídas à insuficiente desinfecção de equipamentos e superfícies (ELLIS et al., 1998).

A salmonelose é uma doença de origem alimentar que acomete grande parte da população. Segundo o Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA) anualmente registram cerca de 40.000 casos dessa doença, sendo 90% provocados por alimentos contaminados, ocasionando várias internações em hospitais e, em algumas ocorrências, com evolução para óbito (JAY, 2005). Em janeiro de 2014, o CDC registrou um surto provocado pela bactéria *Salmonella* Heidelberg - presente em carne de frango comercializada nos EUA - com registro de nove pessoas infectadas e atribuiu ao patógeno fatores de multirresistência. Essa mesma cepa foi responsável pela contaminação de dezessete pessoas em outros doze estados desse mesmo país, sendo que dois desses indivíduos se mostraram resistentes a antibióticos normalmente utilizados no controle dessa toxinfecção. Ainda nos Estados Unidos, no final de 2013, um total de dezessete pessoas foram infectadas pela cepa *Salmonella* Stanley, identificada em queijo de castanha de caju, em três estados, sendo a maioria dos casos (88%) registrada na Califórnia.

No Brasil, os registros de dados epidemiológicos de toxinfecções de origem alimentar são ineficientes. Porém, mesmo com toda a dificuldade de coleta de notificações que sejam estatisticamente significativas, acredita-se que a incidência de doenças provocadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* seja elevada entre a população (SHINOHARA et al., 2008).

Murmann et al. (2008) determinaram a quantidade de *Salmonella* spp. presente em alimentos envolvidos em surtos que ocorreram no Rio Grande do

Sul em 2005 e identificaram a *S. Enteritidis* como sendo a principal causadora de salmoneloses no período mencionado. Nesse estudo, o patógeno foi detectado em alimentos à base de ovos, maionese e frango, concluindo-se que a maioria das contaminações ocorreu por contaminação cruzada e armazenamento em temperatura inadequada.

A avaliação epidemiológica de surtos de salmoneloses ocorridos no Estado do Paraná, no período de 1999 a 2008, mostrou que foram 286 surtos, sendo que, das 5.641 pessoas expostas, 2.027 (35,9%) manifestaram os sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. Os alimentos produzidos com ovos, carnes e derivados também foram apontados como os principais veículos da doença, e a *S. Enteritidis* foi o patógeno mais identificado (KOTTWITZ et al., 2010).

A capacidade da *Salmonella* de formar biofilme também contribui para o aumento do número de surtos de toxinfecções alimentares, pois observa-se o aumento de sua resistência e persistência, seja em superfícies abióticas ou bióticas. Suas fímbrias e flagelos são citados como componentes estruturais importantes na formação dos biofilmes (STEENACKERS et al., 2012). Uma vez na forma de biofilme, as *Salmonellas* mostram-se mais protegidas contra agressões ambientais, presença de antibióticos e desinfetantes, fato que as tornam mais difíceis de serem eliminadas, proporcionando também sua adaptação a diferentes fatores de estresse, dentre eles a exposição a antibióticos e sanitizantes (BURMOLLE et al., 2010; STEENACKERS et al., 2012).

A manifestação da doença causada pela *Salmonella* ocorre por gastroenterite, provocando náusea, vômito e diarreia causados principalmente pelo sorotipo *S. Enterica*, subespécie *enterica*; infecção focal do endotélio vascular provocada pelos sorotipos Choleraesuis e Typhimurium; osteomielite em pacientes com anemia falciforme causada principalmente pelo sorotipo

Typhimurium; e febre tifoide, pelos sorotipos Typhi e Paratyphi A e B (SCHAECHTER et al, 2002).

As infecções por *Salmonella* podem ser graves, especialmente nos muito jovens, idosos ou pessoas imunodeprimidas, com uma dose infectante possível para as pessoas saudáveis de 10^5 a 10^7 UFC (SANTOS et al., 2001). Os genes de virulência responsáveis pela invasão, sobrevivência e propagação do microrganismo nas células do hospedeiro são distribuídos em ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI) (BHUNIA, 2008).

O mecanismo que procura explicar o modo de ação da bactéria envolve os eventos de entrada, disseminação e multiplicação das células no organismo do hospedeiro. Os microrganismos atravessam as células M por meio de células dendríticas e atingem a região subepitelial das células intestinais (BHUNIA, 2008). Sua penetração nas vilosidades ocorre por fagocitose e, por serem resistentes ao conteúdo lisossomal e aos peptídeos antibacterianos sintetizados pelas células epiteliais, tendem a migrar até a lâmina basal, onde chegam à lâmina própria (Figura 1).

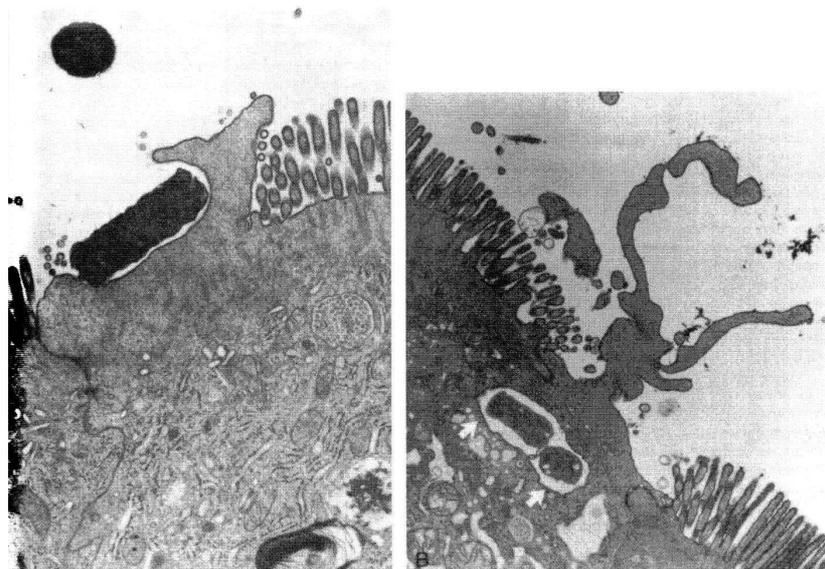


Figura 1 Vilosidades da membrana da célula de um hospedeiro durante a infecção por *Salmonella* (SCHAECHTER et al., 2002).

S. Thyphimurium e *S. Enteritidis* disseminam de forma sistêmica provocando infecções que resultam em danos na mucosa intestinal, causando gastroenterite. Na *S. Thyphimurium*, estão envolvidos cerca de 14 genes do operon *inv*. Eventos bioquímicos (Figura 2) são ativados e, por meio da interação entre a MAP (proteína quinase) e um receptor na superfície da membrana da célula, esta interação permite a ligação do microrganismo, provocando ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂), liberação de ácido araquidônico, produção de prostaglandinas, leucotrienos e aumento da concentração intracelular de cálcio, que induzem a absorção bacteriana e a possível invasão de citocinas inflamatórias, alterando o transporte de eletrólitos e líquido, provocando diarreias (SCHAECHTER et al., 2002).

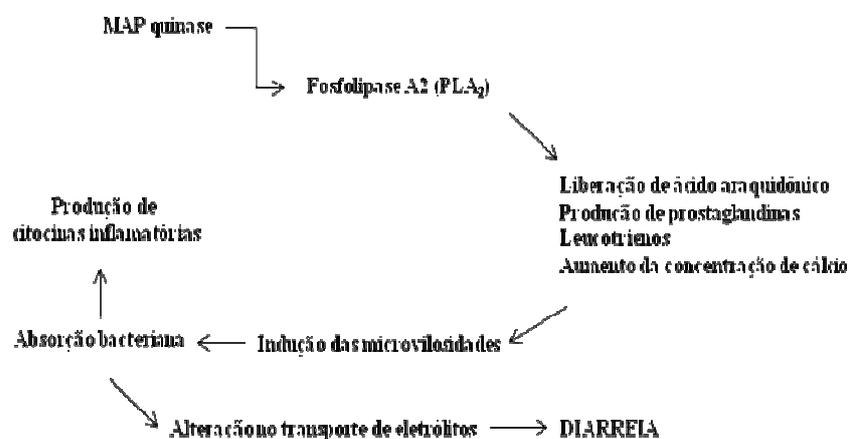


Figura 2 Eventos bioquímicos ativados durante a invasão de *Salmonella* na célula do hospedeiro.

Pesquisas realizadas visando detectar *Salmonella* spp. em alimentos indicam sua presença naqueles com atividade de água acima de 0,94 e ricos em proteínas, como molhos de salada, maionese, linguiças, ovos (CHAO et al., 2007) e frangos (SANTOS et al., 2001). Os ovos são importantes reservatórios de *S. Enteritidis*, pois a bactéria pode colonizar o ovário de galinhas poedeiras, permitindo a contaminação antes da formação da casca, ainda no oviduto do animal. Dessa forma, os ovos armazenados à temperatura ambiente representam potencial fonte de disseminação por conter altas concentrações do microrganismo, até 10^{11} células por ovo (BHUNIA, 2008).

Apesar das melhorias nas condições higiênico-sanitárias no processamento de alimentos, surtos de salmoneloses originados pelo consumo de alimentos contaminados ainda ocorrem e constituem sério problema de saúde pública.

Salmonella spp. pode ser introduzida em indústrias de processamento de alimentos, principalmente pela matéria-prima contaminada e em contato com equipamentos e utensílios, pois ela possui capacidade de formação do biofilme.

Uma vez aderida, a bactéria torna-se fonte de contaminação microbiológica do alimento ao passar pelo local e entrar em contato com a superfície contaminada.

2.2 Biofilmes: conceito, características estruturais, composição e formação

Os biofilmes são definidos como células microbianas sésseis que se organizam em comunidades embebidas por matrizes de substâncias poliméricas extracelulares capazes de se desenvolverem em superfícies bióticas e abióticas e, por adesão, formarem ambiente homeostático dinâmico, onde utilizam todos os nutrientes disponíveis no meio (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007; SUTHERLAND, 2001). Cerca de 95 a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, alternando entre os estados planctônico e sésseis (LYNCH; ROBERTSON, 2008). 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 (STOODLEY et al., 2002; MCLANDBOROUGH et al., 2006).

As características estruturais, capacidade de coesão, morfologia e fisiologia do biofilme são determinadas pela matriz de substâncias extracelulares poliméricas. Os exopolissacarídeos atuam na aderência e defesa das células, proporcionando resistência às condições adversas, como a diminuição de água e nutrientes e presença de antimicrobianos (KIVES; ORGAZ; SANJOSÉ, 2006).

De acordo com Boari et al. (2009), a estrutura das células sésseis apresenta 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.

Os microrganismos não são os únicos constituintes dos biofilmes, mas toda substância extracelular produzida, além de todo componente retido pela

matriz resultante (HOOD; ZOTOLLA, 1995). Sua estrutura apresenta-se adsorvente e porosa, sendo a água considerada a fração mais significativa da massa total, podendo variar entre 70% a 95% (CHARACKLIS, 1981; FLEMMING, 1993). A matéria orgânica da massa seca do biofilme apresenta fração de 70 a 90% de substâncias poliméricas extracelulares (FLEMMING, 1993) e, frequentemente, menos de 10% de microrganismos, embora sejam estes os responsáveis pela produção das substâncias poliméricas (PEREIRA, 2001). Os biofilmes são compostos, predominantemente, por polissacarídeos (FLEMMING, WINGENDER, 1999). Porém, observa-se também a presença de moléculas de proteínas, lipídeos, sais minerais, vitaminas (MACÊDO, 2000) e ácidos nucleicos (JAHN; NIELSEN, 1995).

Desde que em condições adequadas, os biofilmes podem ser constituídos pelos mais variados tipos de microrganismos. Os fungos, protozoários, microalgas, bactérias e vírus são exemplos da diversidade de espécies que pode ser encontrada na matriz (CHARACKLIS, 1990). Porém, as bactérias, por apresentarem características favoráveis, como grande capacidade adaptativa e reprodutiva, altos índices de produção de substâncias, tamanhos reduzidos e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante, são consideradas os microrganismos que mais formam biofilmes (CHARACKLIS, 1990).

Os biofilmes são formados a partir da adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície abiótica, constituindo a camada condicionante (Figura 3). Resíduos proteicos ou lipídicos são elementos importantes na indução do filme condicionante (WATNICK; KOLTER, 2000). As associações microbianas são capazes de crescer em diferentes interfaces: líquido-sólida, líquido-ar, líquido-líquido e superfície sólida-ar, sendo que os biofilmes desenvolvidos em meios aquosos e superfícies sólidas têm sido estudados com mais detalhes (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007).

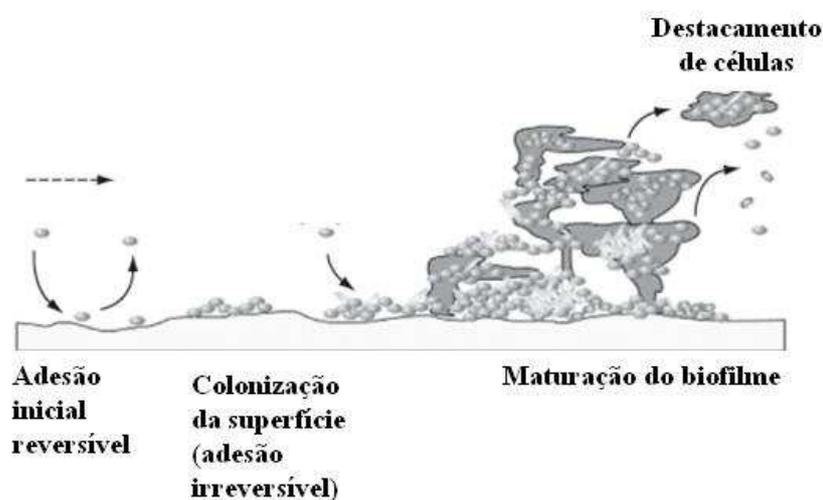


Figura 3 Ciclo do desenvolvimento do biofilme (Adaptado de JENKINSON; LAPPIN-SCOTT, 2001)

A adesão por colonizadores primários constitui a primeira etapa de formação do biofilme e caracteriza-se por apresentar interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionante, elaboradas a partir de resíduos do ambiente (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990). No início da formação ocorre a participação ativa de estruturas de adesão, como fímbrias e flagelos que se encontram presentes na superfície celular (CLONTS, 2008; FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). A cinética em que ocorre a formação inicial do biofilme depende da concentração de nutrientes, da afinidade das moléculas com a superfície e das condições hidrodinâmicas do meio líquido. Características como rugosidade, carga e energia livre são fundamentais para adesão em superfícies abióticas (MARSHAL; BLAINEY, 1990).

A aderência à superfície ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (MITTELMAN, 1998).

A adesão reversível acontece por interação inicial fraca, que ocorre entre o microrganismo e a superfície. Essa interação envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas. Durante o estágio reversível, bactérias são facilmente removidas (WATNICK; KOLTER, 2000). A adesão irreversível resulta da fixação de apêndices, como pili, flagelos, proteínas denominadas de adesinas e/ou da produção de substâncias poliméricas extracelulares (SUTHERLAND, 1997; FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013), fazendo com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990). Essas ligações envolvem interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações covalentes e iônicas. Estudos mostram que a adesão irreversível pode ocorrer em poucas horas de interação entre substrato e superfície (HOOD; ZOTTOLA, 1995; SMOOT; PIERSON, 1998).

Dessa forma, a próxima etapa da formação do biofilme abrange as fases do crescimento e divisão celular, proporcionados pela presença de nutrientes, síntese e excreção de exopolissacarídeos (EPS), que funcionam como adesivos dos microrganismos colonizadores secundários (CLONTS, 2008). O biofilme maduro é constituído por significativo aumento da densidade populacional, produção e adsorção das substâncias presentes na matriz de EPS, possibilitando o acréscimo em sua espessura (CHENG et al., 2007). Dentre os fatores que determinam a maturação do biofilme, destacam-se a disponibilidade e transporte de nutrientes, difusão de oxigênio, osmolaridade, pH interno e excreção de substâncias tóxicas às células (CARPENTIER; CERF, 1993; TOOLE; KOLTER, 1998). 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 (WALTER et al., 2013). Estudos relatam que a remoção

dos microrganismos ocorre ao longo do desenvolvimento do biofilme, e não apenas na fase que sucede a maturação. O desprendimento das células do biofilme pode ocorrer por três diferentes mecanismos físicos: descamação (perda aparentemente aleatória de grandes frações do biofilme), erosão (perda contínua de células individuais ou pequenos aglomerados de células) e abrasão (remoção devido à colisão de partículas sobre a superfície) (DERLON et al., 2008). Outros fatores, como ação de enzimas degradantes da matriz, resposta fenotípica e moléculas sinalizadoras também podem ativar os mecanismos de liberação das células sésseis e retorno destas ao estado planctônico.

A regulação do desenvolvimento do biofilme e o desprendimento das células sésseis após a maturação dependem da densidade populacional e da modulação da expressão gênica, controladas por moléculas sinalizadoras, constituindo fenômeno nomeado *quorum sensing* (CHOPP et al, 2002). As moléculas químicas sinalizadoras, liberadas pelas bactérias capazes de realizar *quorum sensing*, são denominadas autoindutores (WATERS; BASSLER, 2005). A concentração destes autoindutores aumenta em função de elevações na densidade populacional do biofilme. Waters e Bassler (2005) relatam que as bactérias, por serem capazes de detectar o acúmulo de limiares mínimos de estimulação dos autoindutores, alteram sua expressão gênica e, conseqüentemente, seu comportamento. O *quorum sensing* tem sido apontado como fenômeno importante na indução de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, embora sua atuação não esteja totalmente elucidada (MAH; TOOLE, 2001).

As bactérias sésseis formadoras do biofilme maduro passam a expressar sequências gênicas extremamente diferentes daquelas encontradas nas bactérias planctônicas, ocasionando mudanças fenotípicas que podem explicar alguns mecanismos de resistência a defesas do hospedeiro, antimicrobianos e agentes físico-químicos (PRINGENT-COMBARET; LEJEUNE, 1999; COSTERTON,

2005; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Dessa forma, as células organizadas em biofilme passam a apresentar vantagens em relação às células em seu estado planctônico por terem maiores condições de sobrevivência e menores chances de erradicação (MORCK; OLSON; CERI, 2001).

2.3 Biofilmes nas indústrias de alimentos

O desenvolvimento de biofilmes em equipamentos utilizados em indústrias alimentícias, principalmente nos ambientes de processamento, tem causado a redução da eficiência dos processos tecnológicos por elevar as chances de contaminação por microrganismos. Estudos mostram que os biofilmes provocam deterioração nos alimentos, diminuição da vida útil do produto e transmissão de doenças aos consumidores (MANSFELD, 2007; SCHNEIDER, 2007).

Os prejuízos decorrentes da formação do biofilme incluem reduções no desempenho das operações dos equipamentos, danos às superfícies sólidas onde se acumulam e conseqüente aumento com as despesas de limpeza e manutenção das peças dos equipamentos, bem como a perda da qualidade dos produtos (CHARACKLIS, 1990).

O controle de qualidade nas indústrias alimentícias e a higienização nem sempre são efetivas, podendo levar a contaminações por inadequada remoção dos microrganismos das superfícies e instalações que entram em contato com os produtos (BOS et al., 2000). Sendo assim, as falhas na higienização das superfícies possibilitam a aderência dos resíduos orgânicos, geralmente derivados de leite ou de carnes, formando o filme condicionante (KUMAR; ANAND, 1998; WATNICK; KOLTER, 2000) e tornando os equipamentos potenciais fontes de contaminações.

As propriedades das superfícies, como carga elétrica, capacidade de retenção de água, energia livre e topografia, constituem parâmetros importantes para adesão das células e formação do biofilme (PLOUX et al., 2007). Dentre as superfícies utilizadas nas indústrias, destacam-se o aço inoxidável (fabricação de equipamentos), teflon (juntas e acessórios de equipamentos) e polipropileno (tanques, conexões, tubos e superfícies de processamento de alimentos). Estudos mostram que as células aderem-se melhor em superfícies hidrofílicas (aço inoxidável e vidro) do que em superfícies hidrofóbicas (borracha e plásticos).

A eliminação das comunidades microbianas tem sido um desafio constante, e estratégias de prevenção à formação de biofilmes são cada vez mais empregadas nos ambientes industriais (KUMAR; ANAND, 1998; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Walker et al. (1998) consideram a sanificação regular essencial para manutenção dos equipamentos, principalmente na fase inicial, que envolve a adesão do microrganismo e por ser considerada uma etapa bastante rápida e de desenvolvimento da adaptação fenotípica. Entretanto, relatam que na indústria alimentícia é extremamente complicada a sanificação frequente o suficiente para evitar que essa etapa inicial ocorra.

Praticamente todos os microrganismos possuem potencial para formar biofilmes, desde que encontrem ambientes e condições adequados para seu desenvolvimento (MCLANDSBOROUGH et al., 2006). Nas indústrias alimentícias, os deteriorantes mais frequentemente identificados são *Enterococcus faecium*, *Micrococcus* sp., *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas fluorescens*; e, dentre os patogênicos, destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (LERICHE; CARPENTIER, 1995; SMITH; FRATÂMICO, 1995; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

A remoção e o controle dos biofilmes nas indústrias alimentícias devem ser realizados com todos os critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (1988). No entanto, mesmo atendendo a todos esses critérios, os biofilmes podem se instalar nas superfícies utilizadas na indústria - fato decorrente do aumento crescente de microrganismos resistentes aos sanitizantes utilizados frequentemente na indústria, atribuído ao uso inadequado de antibióticos e substâncias antimicrobianas, bem como da transmissão de genes de resistência entre os indivíduos (BORGES et al., 2013). Assim, sanitizantes alternativos têm sido propostos e estudados, dentre eles destacam-se os óleos essenciais, produtos naturais obtidos do metabolismo secundário das plantas.

2.4 Metabólitos secundários de vegetais

Os metabólitos são compostos químicos formados e degradados sob a ação de enzimas específicas que constituem uma rede integrada de reações que visam à manutenção da homeostase dos organismos vivos. Essas reações permitem o aproveitamento de nutrientes e produção de energia por meio de vias denominadas metabólicas (DEWICK, 2009). Dessa forma, o metabolismo celular é constituído pelo conjunto de reações em que podem estar envolvidos metabólitos primários e metabólitos secundários.

O metabolismo primário está relacionado à transformação de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos em moléculas essenciais à formação e manutenção de todas as estruturas celulares, sendo, portanto, comum a todos os seres vivos. Já o metabolismo secundário é responsável pela síntese de substâncias cuja produção e acumulação estão limitadas a vegetais, microrganismos e alguns poucos animais. Os metabólitos secundários não são essenciais para o organismo produtor, porém garantem vantagens adaptativas

que possibilitam sua defesa e conseqüente perpetuação (SANTOS, 2004). Nas células, os metabólitos secundários são sintetizados a partir do acetil-CoA, ácido chiquímico, ácido mevalônico e metileritrol fosfato, que são intermediários da via glicolítica (Figura 4). O acetil-CoA origina fenóis e sua formação ocorre a partir da descarboxilação oxidativa da quebra da molécula da glicose e formação de duas moléculas de ácido pirúvico. O ácido chiquímico é sintetizado a partir da combinação de um intermediário da glicólise (fosfoenolpiruvato) com um componente da via das pentose-fosfato (eritrose-4-fosfato). Sua via leva à formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores dos metabólitos secundários aromáticos, como alcaloides, ácido cinâmico, fenilpropanoides e ligninas. A condensação de três moléculas de acetil-CoA origina o ácido mevalônico, enquanto que, da combinação do piruvato com o gliceraldeído 3-fosfato (via glicolítica), forma-se o metileritrol fosfato. A via biossintética do metileritrol fosfato juntamente com a via do mevalonato originam os esteróis e terpenóides (DEWICK, 2009; SANTOS, 2004). Por apresentarem diversas atividades biológicas, os metabólitos secundários possuem potencial para serem utilizados na produção de fármacos, cosméticos, inseticidas, fungicidas e bactericidas. Os principais metabólitos secundários encontrados com atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA et al., 2008).

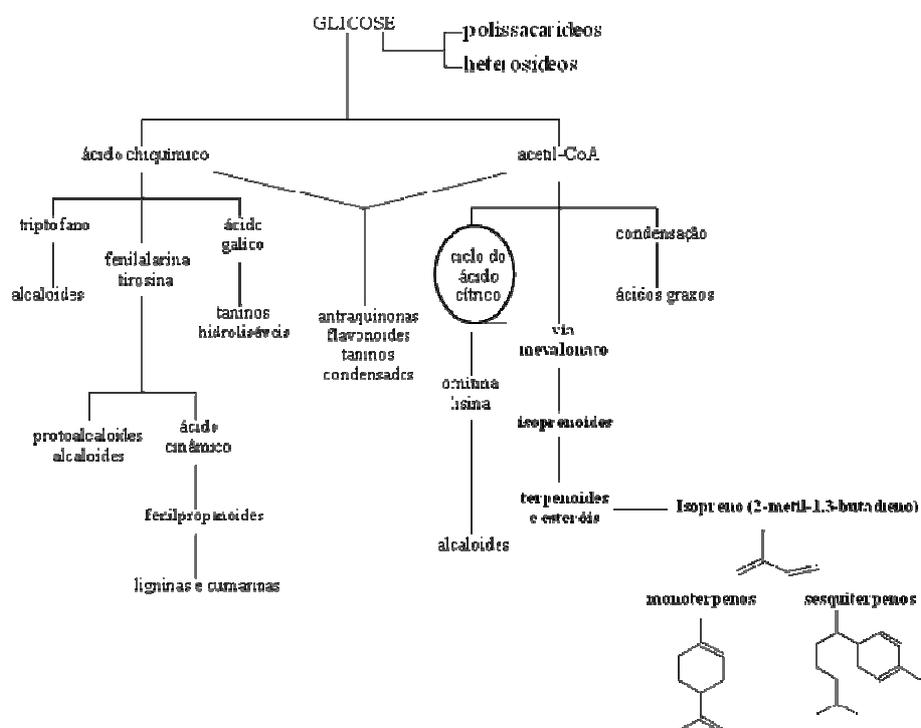


Figura 4 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. Adaptado (SANTOS, 2004).

2.5 Óleos essenciais

As propriedades antimicrobianas dos princípios ativos dos óleos essenciais de plantas aromáticas, inclusive as condimentares, têm despertado o interesse do setor alimentício por constituírem alternativa para o desenvolvimento de novos sanitizantes utilizados no controle e remoção de biofilmes.

Os óleos essenciais são produtos voláteis oriundos do metabolismo secundário das plantas aromáticas formados em células especiais e encontrados em folhas, flores, sementes, caule e raiz (SIMÕES; SPITZER, 2004). Todos os órgãos de uma planta são capazes de sintetizar óleos essenciais, porém sua

composição pode variar segundo a localização, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (OUSSALAH et al., 2007).

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essenciais, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os óleos essenciais são constituídos quimicamente por terpenóides e fenilpropanóides (SIMÕES; SPITZER, 2004). Os terpenóides são encontrados com maior frequência e compreendem todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e são sintetizadas pela via do mevalonato. As unidades de isopreno iniciam a síntese dos compostos terpênicos (SIMÕES; SPITZER, 2004; BOWLES, 2003). Os compostos terpênicos comumente encontrados em óleos essenciais são os monoterpenos (C_{10}) e os sesquiterpenos (C_{15}), formados por duas e três unidades de isopreno respectivamente. Os monoterpenos são as moléculas mais identificadas nos óleos essenciais, cerca de 90%, o que garante uma grande diversidade de estruturas nos óleos voláteis (BAKKALI et al., 2008; BOWLES, 2003). Os fenilpropanóides são responsáveis pelas características flavorizantes e odorizantes. Outros compostos, como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas também podem ser identificados (SIMÕES; SPITZER, 2004). A origem dos metabólitos secundários ocorre a partir da via glicolítica por dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2004).

Os óleos essenciais são misturas naturais complexas constituídas por 20-60 componentes presentes em diferentes concentrações. Geralmente, os

componentes principais, denominados majoritários, determinam suas propriedades biológicas. No meio ambiente, atuam como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e herbívoros, protegendo as plantas contra inimigos naturais e adversidades do nicho ecológico. Podem também favorecer a dispersão de pólenes e sementes (BAKKALI et al., 2008).

2.5.1 Efeito antimicrobiano dos óleos essenciais

O desempenho antimicrobiano de óleos essenciais sobre biofilmes vem sendo avaliado, procurando comprovar a significância da utilização destes compostos como agentes sanitizantes na indústria alimentícia (CHORIANOPOULOS et al., 2008). Nas células bacterianas, o mecanismo de ação desses compostos provoca danos estruturais e funcionais à membrana plasmática (Figura 5) (BURT, 2004; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; BAKKALI et al., 2008). A permeabilidade da membrana da célula é influenciada pela sua composição e da hidrofobicidade dos compostos que a atravessam. Como os óleos essenciais são tipicamente lipofílicos, tendem a se acumular na bicamada lipídica, determinando dessa forma a permeabilidade da estrutura (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). O caráter hidrofóbico dos óleos essenciais provoca alteração na estrutura do envelope celular, e os compostos fenólicos, como timol, carvacrol e eugenol diminuem a fluidez e alteram o perfil lipídico da membrana celular bacteriana (PASQUA et al., 2007).

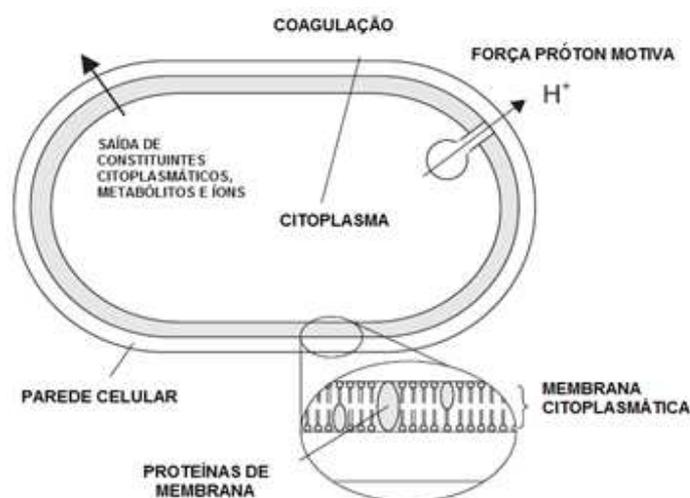


Figura 5 Mecanismo de ação de componentes dos óleos essenciais em células bacterianas. Danos à membrana citoplasmática e proteínas de membrana; e fluxo de constituintes intracelulares; coagulação do citoplasma e depleção da força próton motiva (Burt, 2004).

Dessa forma, a resistência bacteriana a óleos essenciais pode estar ligada à habilidade de partição dos seus componentes na fase lipídica da membrana plasmática. Sua permeabilidade, em bactérias, está relacionada 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 os de potássio e fosfato (LAMBERT et al., 2001; BAKKALI et al., 2008). Sendo assim, danos causados à membrana levam ao comprometimento de suas funções, como barreira seletiva, ação de enzimas e geração de energia (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). A coagulação do citoplasma (GUSTAFSON et al., 1998) e a danificação de proteínas embebidas na membrana citoplasmática (ULTEE; KETS; SMID, 1999) são outras alterações que os efeitos antibacterianos podem provocar nas células desses organismos procaríotos.

2.5.2 Orégano (*Origanum vulgare*)

Origanum vulgare é um vegetal aromático, condimentar, perene, herbáceo e rasteiro pertencente à família Lamiaceae. O orégano emana perfume fresco e conforme a região onde se encontra é conhecido como orégão, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997).

Originário da Europa e da Ásia, o orégano desenvolve-se espontaneamente em solos pedregosos e prados, porém adapta-se melhor em regiões de clima temperado e solos bem férteis, de natureza calcária, permeáveis, secos, que recebam bastante luz solar (VON HERTWING, 1991).

Seu óleo essencial é considerado potente bactericida e fungicida. Silva Júnior e Verona (1997), pesquisando os extratos da planta, verificaram a presença de timol, carvacrol, sabineno, p-cimeno e carifileno e apontaram esses como os responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e anti-inflamatórias. O timol e o carvacrol apresentam atividade sobre a oxidação lipídica sendo considerados antioxidantes consagrados, a atividade oxidante destes compostos fenólicos está relacionada com a presença de radicais hidroxil ligados ao anel aromático, capazes de doar átomos de hidrogênio com elétrons e estabilizar radicais livres (Figura 6). O radical formado é estabilizado pelas estruturas de ressonância na molécula (BAYDAR et al., 2004).

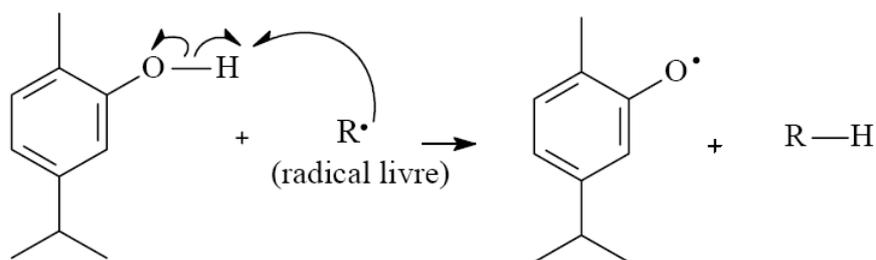


Figura 6 Estrutura do carvacrol sendo atacada por um radical livre (R*) (LIMA; PIMENTEL; MORAIS, 2008).

O timol (4-isopropil-2-metilfenol) e o carvacrol (2-isopropil-5-metilfenol) são isômeros, se diferenciando apenas pela posição do grupo hidroxila (Figura 7). No carvacrol o grupo hidroxila está na posição orto em relação a um grupo metil e na posição meta em relação ao grupo isopropil, enquanto que no timol o grupo hidroxila está na posição orto em relação ao isopropil e meta em relação ao grupo metil (SOLOMONS; FRYLHE, 2005).

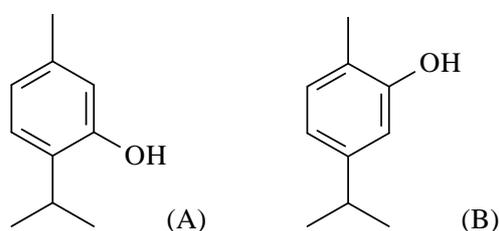


Figura 7 Estruturas químicas dos compostos timol (A) e carvacrol (B)

Knowles et al. (2005) avaliaram a ação antimicrobiana do carvacrol em diferentes estágios do biofilme multiespécie desenvolvido por *S. aureus* e *S. Typhimurium* e observaram redução no número de células de *S. aureus* de cerca de 2,5 Log UFC durante os primeiros estágios de formação, causando diminuição significativa tanto da população no biofilme maduro quanto de 3 Log UFC do biofilme de *Salmonella Typhimurium*.

2.5.3 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

Thymus vulgaris L. é uma planta aromática e condimentar pertencente à família Lamiaceae, é conhecida no Brasil como tomilho, arçã, arçanha, poejo, segurelha, timo, tomilho-ordinário e tomilho-vulgar. 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; VERONA, 1997; MARANCA, 1985; 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 responsáveis pelas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias associadas ao vegetal (SHAN, 2002). O carvacrol é sempre encontrado em plantas que contêm timol, mostrando inclusive uma espécie de mutualismo entre os dois compostos (SÁEZ, 1995). Estudos de extratos hexanólicos de flores e folhas de *Thymus vulgaris* mostraram, através da cromatografia gasosa, grande concentração de terpenos hidrocarbonetos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos (GUILLÉN; MANZANOS, 1998).

Encontrado também em óleo essencial de hortelã, o timol ocorre como grandes cristais incolores ou como pó cristalino branco. A gama de propriedades antimicrobiana é variada, graças ao poder antisséptico e bactericida de seus componentes; timol e seu isômero de posição, o carvacrol - presentes no óleo de tomilho (CARDOSO et al., 2001).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria n. 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, 5 set. 1988.

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products an international Journal**, v. 19. p. 231-236, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; GÜLCAN, O.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra, and Satureja species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169–172. 2004.

BHUNIA, A. K. **Foodborne Microbial Pathogens – Mechanisms and Pathogenesis**. Food Science Text Series. Spring Science Business Media, LLC, 2008, 276 p.

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; REIS, V. M.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R. H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M.J. SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, 2013.

BOS, R.; VAN DER MEI, H.C.; GOLD, J.; BUSSCHER, H. J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 189, n.2, p. 311-315, Aug. 2000.

BOWLES, E. J. **The Chemistry of aromatherapeutic oils**. 3 ed. Allen&Unwin. 2003, 257p.

BURMOLLE, M.; THOMSEN, T. R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L.; HOMOE, P. Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity-monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 324-336, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELÚ-FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. 81 p. (Textos acadêmicos).

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 6, p. 499-511, Dec. 1993.

CDC. Multistate Outbreak of *Salmonella* Stanley Infections Linked to Raw Cashew Cheese (Final Update).
Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/stanley-01-14/index.html>.
Acesso: 18 de fevereiro de 2014.

CDC. Outbreak of *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Tyson Brand Mechanically Separated Chicken at a Correctional Facility.
Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-01-14/>.
Acesso: 18 de fevereiro de 2014.

CHAO, M. R.; HSIEN, C. H.; YEH, C. M.; CHOU, S. J.; CHU, C.; SU, Y. C.; YU, C.Y. Assessing the prevalence of *Salmonella enterica* in poultry hatcheries by using hatched eggshell membranes. **Poultry Science**, v. 86, p. 1651-1655, 2007.

CHARACKLIS, W. G. Fouling biofilm development: a process analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 23, n. 9, p. 1923-1960, 1981.

CHARACKLIS, W.G. Laboratory biofilm reactors. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. (Ed.). **Biofilms**. New York: J. Wiley and Sons, p. 55-89, 1990.

CHENG, C.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; BRYERSAND, J. D.; JIANG, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 29, p. 4192-4199, Oct. 2007.

CHOPP, D.L.; KIRISITIS, M.J.; MORAN, B.; PARSEK, M.R. A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 29, p. 339-346, 2002.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. M.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, June 2008.

CHRISTENSEN, B.E.; CHARACKLIS, W.G. Physical and chemical properties of biofilms. In: CHARACKLIS, W.G.; MARSHALL, K.C. (Ed.) **Biofilms**. New York: J. Wiley and Sons, p. 93-130, 1990.

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

COSTERTON, J.W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 437, p. 7-11, Aug. 2005.

DERLON, N.; MASSÉ, A.; RENAUD, E.; BERNET, N.; PAUL, E. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. **Water Research**, v. 42, p. 2102-2110, April 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**. 3 ed. United Kingdom John Wiley & Sons Ltd . 2009, 546 p.

ELLIS, A.; PRESTON, M.; BORCZYK, A.; MILLER, B.; STONE, P.; HATTON, B. A community outbreak of *Salmonella* berta associated with a soft cheese product. **Epidemiology and Infection**, v. 120, n.1, p.29–35, 1998.

FLEMMING, H.C. Biofilms and environmental protection. **Water Science and Technology**, London, v.27, n. 7-8, p. 1-10, 1993.

FLEMMING, H.C.; WINDENGER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilm construction material. In: WEBER, J.; SAND, W. (Ed). **Biofouling and materials: COST 520 workshop**. Bern: EDMZ, p. 2-18, 1999.

FUENTE-NÚÑES, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, p. 580-589, 2013.

GUILLÉN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant, **Food Chemistry** Oxford, v. 63, n. 3, p. 373-383, 1998.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; WYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.

JAHN, A.; NIELSEN, P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. **Water Science and Technology**, London, v. 32, n. 8, p. 157-164, 1995.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711 p.

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 9-10, 2001.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSÉ, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Amsterdã, v. 52, n. 2, p.123-127, 2006.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803, Feb. 2005.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. M. S.S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 32, n.1, p. 9-15, 2010.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1-2, p. 9-27, June 1998.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella* Typhimurium in Single and Binary- species Biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 11, p. 1186-1191, Nov. 1995.

LIMA, R. K. de.; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, v. 31, p. 1476-1480, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.

LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 59, p. 415-428, 2008.

MACÊDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**. São Paulo, v.2, n.7, Nov/dez, p. 19-24, 2000.

MAH, T.H.C.; TOOLE, G.A.O'. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, Japan, v. 9, p. 34-38, 2001.

MANSFELD, F. The interation of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**. New York, v. 52, p. 7670-7680, 2007.

MARANCA, G. **Plantas aromáticas na alimentação**. São Paulo: Nobel, 1985, 259 p.

MARSHAL, K. C.;BLAINEY, B. L. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: FLEMMING, H.C.; GEESEY, G.G. (Ed.) **Biofouling and biocorrosion in industrial water systems**. Heidelberg: Springer, p. 29-45, 1990.

MCLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, v. 1, n. 2, p. 94-114, June 2006.

MITTELMAN, M. W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2760-2764, Oct. 1998.

MORCK, D. W.; OLSON, M. E.; CERI, H. Microbial biofilms: preservation, control and removal. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Desinfection, sterilization and preservation**. Lippincott: Williams & Wilkins, p. 675-681, 2001.

MURMANN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of Salmonella isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 529-534, 2008.

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

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli 0157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May. 2007.

PASQUA, R. D.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 4863-4870, 2007.

PEREIRA, M. O. P de O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 234 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, Braga, 2001.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PLOUX, L. Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Amsterdam, v. 57, n. 2, 174-181, 2007.

PRINGENT-COMBARET, C.; LEJEUNE, P. Monitoring gene expression in biofilms. **Methods Enzymology**, New York, v. 310, p. 56-79, 1999.

ROWE, B.; HUTCHINSON, D. N.; GILBERT, R. J.; HALES, B. H.; JEPSON, M., BEGG; N. T. Salmonella Ealing infections associated with consumption of infant dried milk. **The Lancet**, v. 17, n. 2, p. 900–903, Oct. 1987.

SÁEZ, F. Essential oil variability of thymus vulgaris growing wild in southeastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 431-438, nov. 1995.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; RIBEIRO, A. R.; SALLE, C. T. P.; LOPES, R. F. F. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; RIBEIRO, A.R.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 247-250, 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, p. 467-495, 2004.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002. 642 p.

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes Microbianos. **Microbiologia em Foco**. n. 2, v. 1, p. 4-12, 2007.

SHAN, A. Y. K. V. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2002.

SHINOHARA, N. K. S.; BEZERRA, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L. M.; DUTRA, R. A. F.; LIMA, J. L. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

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.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí, SC: Ministério de Meio Ambiente, Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997, 456 p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: 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.

SMITH, J.L.; FRATÂMICO, P.M. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 6, p. 696-708, June 1995.

SMOOT, L. M.; PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 10, p. 1293-1298, Oct. 1998.

SOLOMONS, T. W.; FRYLHE, C. B. **Química Orgânica**. LTC, 8 ed., v. 1, 2005.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C.J.; Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; CONSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, Jan. 2002.

SUTHERLAND, I.W. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 9, p. 1911-1917, 1997.

SUTHERLAND, I.W. The biofilm matrix: an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 222-227, May. 2001.

TODD, E. C. D., GREIG, J. D., BARTLESON, C. A., MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. **Journal of Food Protection**, v. 72, n.1, p.202-219, 2009.

TOOLE, G.O.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent, signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 28, p. 449-461, 1998.

TUNON, G.I.L.; NUNES, R. N.; SILVA, T.M.; CALASANS, M.W.M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella sp isolada de carne de frango resfriada* comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5, n. 52, p. 4-6, 2008.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, Oct. 1999.

VESTBY, L.K.; MORETRO, T.; BALANCE, S.; LANGSRUD, S.; NESSE, L.L. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. **BMC Veterinary Research**. p. 5-20, 2009.

VON HERTWIG, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais**: plantio, colheita, secagem, comercialização. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991,414 p.

WALKER, J. T.; HANSON, K.; CALDWELL, D.; KEEVIL, C. W. Scanning confocal laser microscopy study of biofilm induced corrosion on copper plumbing tubes. **Biofouling**, Abingdon, v. 12, p. 333-344, 1998.

WALTER, M.; SAFARI, A.; IVANKOVIC, A.; CASEY, E. Detachment characteristics of a mixed culture biofilm using particle size analysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p.1140-1147, 2013.

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 21, p. 319-346, 2005.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, n. 10, p. 2675-7679, May 2000.

ZANCAN, F.T. **Pesquisa de Salmonella em caixas de transporte de pintos de um dia de idade**. 1998. 34 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, 1998.

CAPÍTULO 2 Estudo da adaptação de *Salmonella enterica* Enteritidis à concentrações subletais de soluções de óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e seus compostos timol e carvacrol

RESUMO

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorovar Enteritidis é uma bactéria causadora de toxinfecção alimentar considerada reemergente, com capacidade de formar biofilme e habilidade de adaptação às condições de estresse, sendo, seu controle, de grande interesse na indústria de alimentos. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a atividade bactericida das soluções de óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Origanum vulgare* (orégano) e seus compostos majoritários, timol e carvacrol, sobre células planctônicas e sésseis de *S. Enteritidis*, bem como sua resposta adaptativa às concentrações subletais das soluções de óleos e seus compostos. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada e a bactéria estudada foi considerada “fortemente formadora de biofilme”. As soluções apresentaram atividade bactericida contra *S. Enteritidis* na forma planctônica e sésil, porém foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,05$). Para as células planctônicas, a solução de carvacrol a 0,25% (v/v) foi a mais eficaz e o biofilme formado pela bactéria foi mais sensível à solução de orégano a 2,0% (v/v). Foi observada adaptação da bactéria à concentração subletal para todos os tratamentos ($p < 0,05$). As soluções de óleos essenciais e compostos estudadas podem ser consideradas alternativas no desenvolvimento de sanitizantes utilizados em indústrias de alimentos.

Palavras-chaves: Doenças transmitidas por alimentos. Orégano. Tomilho. Sanitizante

ABSTRACT

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Enteritidis is a bacterium causes food poisoning considered re-emerging with the ability to form biofilm and ability to adapt to stress conditions, such their control, of great interest in the food industry. The objectives of this study were to the evaluate the bactericidal activity of the solutions of essential oils of *Thymus vulgaris* (thyme) and *Origanum vulgare* (oregano) and its major compounds, thymol and carvacrol, on planktonic and sessile cells of *S. Enteritidis* and its adaptive response to sublethal concentrations of the solutions of oils and compounds. The ability of biofilm formation was assessed and the bacteria studied was considered "strongly biofilm-forming". The bactericidal activity against solutions showed in *S. Enteritidis* planktonic and sessile shape, but significant differences were found between the concentrations ($p < 0.05$). For planktonic cells, carvacrol to 0,25% (v/v) solution of was the most effective and the biofilm formed by the bacterium was more sensitive to the solution of oregano to 2.0 % (v/v), adaptation of the bacteria was observed at sub -lethal concentration for all treatments. The solutions of essential oils and compounds studied could be considered in the development of alternative sanitizers used in the food industry.

Keywords: foodborne illness, oregano, thyme, sanitizing

1 INTRODUÇÃO

Os biofilmes formados por bactérias patogênicas são responsáveis por grande número de contaminações em superfícies e equipamentos utilizados pelas indústrias de processamento de alimentos. Essas contaminações têm sido motivo de preocupações para o setor alimentício, pois os biofilmes constituem fonte permanente de propagação microbiana, podendo afetar a qualidade dos alimentos e constituir sérios riscos à saúde pública (BARNES et al., 1999).

Salmonella spp. é capaz de formar biofilme e tem se destacado por ser responsável por inúmeros casos de toxinfecções alimentares, sendo um dos principais microrganismos envolvidos em surtos registrados em vários países (MAIJALA; RANTA; SEUNA, 2005). Ilustrando a gravidade do problema que *Salmonella* tem representado, no mês de janeiro de 2014 o RASFF-portal (Rapid Alert System for Food and Feed) disponibilizado on-line pela Comissão Europeia (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal>) relata pelo menos doze rejeições de fronteira de diversos alimentos como tempero desidratado, carne moída ou cortes refrigerados de frango devido à presença de *Salmonella* spp.

Adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, muitas vezes por contaminação cruzada, *Salmonella* é responsável pela maioria das gastroenterites relatadas, sendo as carnes de aves, ovos e produtos derivados, os principais alimentos veículos deste microrganismo ao homem (YUSTE; MORMUR, 2010).

Fato importante é que os microrganismos, quando em biofilme, têm sua fisiologia modificada, tornando-se mais resistentes aos agentes antimicrobianos, antibióticos e sanitizantes disponíveis no mercado. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos (MAH; TOOLE, 2001). Dentre elas destacam-se as limitações

difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos em biofilme e desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração na modulação da expressão gênica celular (BEER; SRINIVASAN; STEWART, 1994; DONLAN; COSTERTON, 2002).

Dessa forma, os antimicrobianos naturais têm sido alternativa para controlar os biofilmes formados por esses agentes patogênicos. Os óleos essenciais e seus compostos majoritários são considerados eficientes, pois pesquisas têm mostrado que possuem atividade antimicrobiana contra vários microrganismos (OUSSALAH et al., 2007). Estudos mostraram que soluções de óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus* foram eficientes em eliminar biofilme de *Salmonella* Enteritidis (VALERIANO et al., 2012). Outros trabalhos mostram a eficiência de soluções de óleos essenciais sobre biofilmes de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012a; OLIVEIRA et al., 2012b; MILLEZI et al., 2012)

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a ação sanitizante dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Origanum vulgare* (orégano) e seus compostos majoritários, timol e carvacrol, sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* Enteritidis; e avaliar sua resposta adaptativa a concentrações subletais desses óleos e compostos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais e compostos majoritários

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho branco) foram adquiridos na Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os componentes majoritários dos óleos essenciais, conforme especificado pelo fornecedor, para o óleo de orégano foram: carvacrol (71%), γ -terpineno (4,5%), β -cariofileno (4,0%); p-cimeno (3,5%), timol (3,0%), e para o óleo essencial de tomilho: timol (47,3%), p-cimeno (26,8%), γ -terpineno (6,0%), linalol (5,2%), carvacrol (3,1%), α -pineno (2,2%), mirceno (1,4%), 1,8-cineol (1,3%), borneol (0,9%), canfeno (0,8%) e β -cariofileno (0,8%). Os compostos timol (99,5% de pureza) e carvacrol (98% de pureza) foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

2.2 Microrganismo, estocagem e padronização do inóculo

A bactéria utilizada foi *Salmonella enterica* subespécie *enterica* Enteritidis S64 doada pelo LABENT (Laboratório de Enterobactérias) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). A cultura estoque foi armazenada em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL, pH 7,0). A cultura foi descongelada à temperatura ambiente e reativada inoculando-se alíquotas de 100 μ L em tubos contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubada a 37°C/24h. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação, alíquota de 50 μ L do inóculo foi transferida para 300 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubada a 37°C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro

(D.O.600 nm) e plaqueamento em Agar Triptona de Soja (TSA) com incubação a 37°C/24h. A cultura foi padronizada em 10^8 UFC mL⁻¹

2.3 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) das células planctônicas

A concentração mínima bactericida dos óleos essenciais e de seus compostos majoritários, timol e carvacrol, foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com adaptações.

Para tanto, soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e de óleos essenciais ou compostos foram obtidas nas seguintes concentrações (%): 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,00 (v/v). Foram adicionadas nas cavidades 150 µL das soluções e inoculadas 10 µL da cultura padronizada. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h e determinada a concentração do óleo essencial e do composto capaz de matar as células de *Salmonella* Enteritidis, determinando-se, assim, a mínima concentração bactericida do óleo essencial ou composto testado.

O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições e utilizados dois controles para cada óleo essencial e composto testados; sendo um controle negativo, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e óleo essencial ou seus compostos e um controle positivo, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e inóculo.

2.4 Formação de biofilme em microplaca

Os biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 µL de cultura padronizada em

150 μ L de TSB e incubação a 37°C/48h. Após esse período a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%) para remoção das células não aderidas. Para o controle negativo foram adicionados nas cavidades 200 μ L de TSB. Solução de cristal violeta (0,1% m/v) foi adicionada no volume de 200 μ L em cada cavidade já lavada. Após 10 minutos de contato, o cristal violeta foi cuidadosamente retirado e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina. Os biofilmes, visíveis como anéis corados nas paredes das cavidades, foram desprendidos, após secagem das placas ao ar, pela adição de 200 μ L de etanol 95% (v/v). Após 10 minutos, os conteúdos das cavidades foram homogeneizados e transferidos para novas cavidades de nova microplaca. A concentração de cristal violeta na fase líquida foi avaliada medindo-se a absorbância a 600 nm em leitor de microplaca (Anthos 2010) (adaptado de MERRITTI et al., 2005). Para determinar a capacidade de formação de biofilme, foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn < Doa \leq 2 \times Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \times Docn < Doa$). Onde Doa é a densidade óptica do biofilme e Docn 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.

2.5 Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB)

Os biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 μ L de cultura padronizada em 150 μ L de TSB e incubação a 37°C/48h. Após esse período a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%)

para remoção das células não aderidas. Os óleos essenciais e seus compostos foram adicionados às cavidades em diferentes concentrações. As soluções foram preparadas em água destilada estéril acrescentada de 0,5% de Tween 80 e homogeneizadas por agitação vigorosa em vórtex por 2 minutos. Foram utilizadas as seguintes concentrações (%) (v/v): 0,00; 0,01; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50 e 5,00. Alíquotas de 200 µL das soluções de óleos essenciais ou seus compostos foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de contato as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%). Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h e determinada as concentrações de óleos essenciais e dos compostos capazes de matar o biofilme, sendo essa considerada a Concentração Mínima Bactericida do Biofilme. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

2.6 Determinação da adaptação do biofilme de *Salmonella Enteritidis* à concentrações subletais das soluções de óleos essenciais e compostos

A adaptação de *S. Enteritidis* à concentrações subletais dos óleos essenciais e seus compostos foi realizada. Para determinação das concentrações subletais dos óleos essenciais e seus compostos, foram realizados testes e observação do crescimento dos microrganismos em concentrações reduzidas daquelas reveladas como bactericidas. Os testes com ¼ da CMB do biofilme inibiu o crescimento de todas as células, então foram realizados outros testes para determinação da concentração máxima subletal (CMS) que permite o crescimento do microrganismo (PASQUA, et al., 2010). Dessa forma, definiu-se ¼ da CMB das células planctônicas como a quantidade ideal para as concentrações subletais das soluções estudadas. Soluções de TSB acrescidas de

0,5% de Tween 80 e óleos essenciais e seus compostos nas concentrações subletais: tomilho (0,12%), timol (0,12%), orégano (0,25%) e carvacrol (0,06%) foram adicionadas no volume de 150 μ L nas cavidades e inoculados 50 μ L da cultura padronizadas. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C/48h. Após esse período, foram realizados simultaneamente dois testes:

2.6.1 Atividade antibiofilme dos óleos essenciais e seus compostos

Após o cultivo das células e possível formação de biofilme, a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%) para remoção das células não aderidas. A capacidade de formação de biofilme pelas células cultivadas em concentrações subletais nas cavidades de poliestireno foi então determinada como descrito no item 2.5 e a classificação conforme sugerido por Stepanovic et al. (2000), sendo os valores obtidos comparados com o desenvolvimento dos biofilmes sem adição dos óleos ou seus compostos.

2.6.2 Determinação da concentração mínima bactericida

Após formação de biofilme como descrito no item 2.5, a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%) para remoção das células não aderidas. Os óleos essenciais e seus compostos foram adicionados às cavidades em diferentes concentrações. As soluções foram preparadas em água destilada estéril acrescentada de 0,5% de Tween 80 e homogeneizadas por agitação vigorosa em vórtex por 2 minutos. Foram utilizadas as seguintes concentrações (% v/v): 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0. As soluções de óleos essenciais foram adicionadas no volume de 200 μ L as cavidades. Para cada concentração foram feitas triplicatas. Após 20 minutos de

contato as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%). Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h e determinada as concentrações de óleos essenciais e dos compostos capazes de matar o biofilme. A adaptação das células em biofilme à concentração subletal das soluções de óleos essenciais e compostos foi verificada pela comparação entre os valores de concentração mínima bactericida determinada para biofilme antes e depois da adaptação.

O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

2.7 Análises estatísticas

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se o valor-p $\leq 0,05$. Para a análise dos dados utilizou-se o programa SPSS 19.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana das soluções à base dos óleos essenciais de orégano e tomilho, bem como dos componentes monoterpênicos timol e carvacrol sobre células planctônicas de *S. Enteritidis*, é mostrada na Tabela 1. Os resultados mostram que as soluções apresentaram atividade bactericida em diferentes concentrações. A solução de carvacrol a 0,25% (v/v) foi a mais eficaz sobre as células planctônicas. Não foram encontradas diferenças entre as atividades bactericidas das soluções de tomilho e timol, pois a concentração 0,50% para as duas soluções foi o suficiente para inibir totalmente o desenvolvimento da bactéria. *S. Enteritidis* mostrou menor sensibilidade à solução de orégano 1% (v/v).

Tabela 1 Concentração Mínima Bactericida das soluções dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre células planctônicas de *S. Enteritidis*

Concentração (% v/v)	Orégano	Tomilho	Timol	Carvacrol	Valor de p ¹
0,00	-	-	-	-	1,000
0,01	-	-	-	-	1,000
0,03	-	-	-	-	1,000
0,06	-	-	-	-	1,000
0,12	-	-	-	-	1,000
0,25	-	-	-	+	0,012
0,50	-	+	+	+	0,012
1,00	+	+	+	+	1,000

¹As diferentes concentrações foram comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $\alpha = 0,05$; (-) não bactericida (+) bactericida

O óleo essencial de orégano a 1,00%, considerando-se os valores observados na quantificação dos seus componentes, possui 71% de carvacrol, valor superior aos 25% de carvacrol (98% de pureza) que foram capazes de inibir totalmente o desenvolvimento das células planctônicas, enquanto que, entre o óleo essencial de tomilho e o timol (99,5% de pureza), não foram

observadas diferenças. As diferenças observadas na atividade bacteriana existente entre os óleos essenciais podem estar relacionadas com as possíveis interações sinérgicas entre seus constituintes químicos, configuração estrutural dos componentes e sua natureza (CHANG; CHEN; CHANG, 2001).

Govaris et al. (2010) avaliaram a propriedade antibacteriana do óleo essencial de orégano sobre *S. Enteritidis* e observaram inibição do crescimento do microrganismo à concentração de 0,9%, valores próximos aos observados neste trabalho. A variação de valores justifica-se pela diferença entre as quantidades de compostos majoritários (carvacrol – 80,15% e timol – 4,82%). Outros estudos também mostraram a atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano sobre *Salmonella* spp (GÜNDÜZ; GÖNÜL; KARAPINAR, 2010a; 2010b).

Conforme observa-se na Tabela 2, *Salmonella* Enteritidis foi capaz de formar biofilme, sendo considerada “fortemente formadora de biofilme”, fato observado também por Steenackers et al. (2012), que relatam que células de *Salmonella* são formadoras de biofilme em superfícies de placas de poliestireno.

Vestby et al. (2009) encontraram correlação entre a capacidade de formação de biofilme em 111 diferentes cepas de *Salmonella* isoladas em fábricas de farinha de peixe e sua persistência no ambiente das instalações. Castelijm et al. (2013) também observaram a formação de biofilme de *Salmonella* spp. em diferentes superfícies, e os resultados foram semelhantes aos encontrados neste estudo, pois todas as cepas (*S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* e *S. Infantis*) mostraram grande habilidade para formar biofilme em superfície de poliestireno. Estes mesmos autores não encontraram diferenças significativas entre a formação de biofilmes por *Salmonella* spp. sobre poliestirenos em relação ao aço inoxidável, ambos muito utilizados em equipamentos em superfícies de indústrias alimentícias.

Tabela 2 Capacidade de formação de biofilme em placas de poliestireno de *S. Enteritidis* crescidas em presença de concentração subletal dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol

Tratamento	DOA	DOCN	Formação de Biofilme
Sem óleo	0,277±0,025	0,068±0,002	FFB
orégano (0,25%)	0,298±0,027	0,068±0,002	FFB
tomilho (0,12%)	0,279±0,024	0,068±0,002	FFB
timol (0,12%)	0,282±0,022	0,068±0,002	FFB
carvacrol (0,06%)	0,304±0,030	0,068±0,002	FFB

Não Formadora de Biofilme - NF ($Doa \leq Docn$), Fracamente Formadora de Biofilme - FF ($Docn < Doa \leq 2 \times Docn$), Moderadamente Formadora de Biofilme - MF ($2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$) e Fortemente Formadora de Biofilme - FFB ($4 \times Docn < Doa$). Onde Doa é a densidade óptica do biofilme e Docn é a densidade óptica do controle de crescimento negativo (STEPANOVIĆ et al., 2000)

Estudos relatam que os óleos essenciais têm atividade antibiofilme sobre diferentes isolados de *Staphylococcus aureus* (ADUKWU; PHILLIPS, 2012). Assim, buscou-se avaliar essa atividade sobre *S. Enteritidis*. Contudo, mesmo em presença dos óleos ou seus compostos, em concentrações subletais, houve formação de biofilme - fato mostrado pela comparação das medidas de absorvâncias de crescimento bacteriano nas concentrações subletais e sem a adição de antimicrobiano.

O biofilme formado em placas de poliestireno foi testado nas mesmas concentrações capazes de inibir o desenvolvimento das células planctônicas, não sendo notada nenhuma atividade antimicrobiana (Tabela 3), o que confirma o comportamento diferenciado dessas células quando organizadas em comunidades e embebidas em substâncias poliméricas extracelulares (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007; TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; GILBERT et al., 2001).

Para Morck, Olson e Ceri (2001), as células organizadas em biofilme passam a apresentar vantagens em relação às células em seu estado planctônico por terem maiores condições de sobrevivência e menores chances de erradicação (MORCK; OLSON; CERI, 2001).

Tabela 3 Concentração Mínima Bactericida das soluções dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre biofilme de *S. Enteritidis*.

Concentração (% v/v)	Óleo essencial				Valor de p ¹
	orégano	tomilho	timol	Carvacrol	
	Biofilme				
0,00	-	-	-	-	1,000
0,01	-	-	-	-	1,000
0,03	-	-	-	-	1,000
0,06	-	-	-	-	1,000
0,12	-	-	-	-	1,000
0,25	-	-	-	-	1,000
0,50	-	-	-	-	1,000
1,00	-	-	-	-	1,000

¹ As diferentes concentrações foram comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$; (-) não bactericida (+) bactericida.

Na Tabela 4, observa-se o comportamento dos biofilmes formados por *S. Enteritidis* expostos às soluções de óleos e compostos testadas. Foram encontradas diferenças significativas para as diferentes concentrações ($p < 0,05$). A maior sensibilidade foi atribuída à solução de orégano 2,0% (v/v), seguida da capacidade bactericida das soluções de tomilho e carvacrol 2,5% (v/v), enquanto que a solução de timol 3,0% (v/v) foi a menos eficaz no controle do biofilme.

Os resultados mostraram variações em relação aos encontrados para células planctônicas. Quando em biofilme, a bactéria foi mais sensível ao óleo de orégano, fato que pode ser explicado pelo comportamento diferenciado entre células planctônicas e em biofilmes.

Os compostos voláteis carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno contribuem para atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e tomilho, sendo o timol e o carvacrol os mais significativos pelo amplo espectro de ação sobre bactérias e outros microrganismos (KHANJARI; KARABAGIAS; KONTOMINAS, 2013; KULISIC et al, 2004; LAMBERT et al., 2001; SILVA et al., 2010).

Tabela 4 Concentração Mínima Bactericida das soluções dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre biofilme de *S. Enteritidis* e adaptação da bactéria à concentração subletal das soluções.

Concentração (% v/v)	Óleo essencial				Valor de p ¹
	orégano	tomilho	timol	Carvacrol	
Biofilme					
2,00	+	-	-	-	1,000
2,50	+	+	-	+	0,012
3,00	+	+	+	+	0,012
3,50	+	+	+	+	0,012
4,00	+	+	+	+	0,012
4,50	+	+	+	+	0,012
5,00	+	+	+	+	1,000
Adaptação					
2,00	-	-	-	-	0,392
2,50	-	-	-	-	0,392
3,00	-	-	-	-	0,012
3,50	-	-	-	-	0,012
4,00	-	-	-	-	0,041
4,50	-	+	-	+	0,300
5,00	+	+	-	+	0,037
6,00	+	+	+	+	0,748

¹ As diferentes concentrações foram comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$; (-) não bactericida (+) bactericida

Para Ultee, Bennik e Moezelaar (2002) a atividade bactericida desses compostos fenólicos pode ser atribuída, entre outros fatores, à presença do grupo hidroxila em comum. Os componentes encontrados em menores proporções também colaboram com a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Portanto, o que caracteriza sua eficácia sobre o microrganismo a ser eliminado é a ação simultânea de vários compostos, que irão atuar em diferentes estruturas na célula (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

O mecanismo exato de ação dos óleos essenciais ainda não é muito claro. Porém, existem trabalhos que procuram explicar sua atividade nas células bacterianas (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; BAKKALI et al., 2008; PASQUA, 2007). Em baixas concentrações, os compostos fenólicos podem

afetar a atividade enzimática da célula, particularmente as enzimas associadas à produção de energia. Já em elevadas concentrações, provocam a desnaturação de proteínas. Esses compostos têm a capacidade de alterar a permeabilidade da célula, levando à perda de moléculas intracelulares, como ribose e glutamato de sódio (KHANJARI; KARABAGIAS; KONTOMINAS, 2013).

Carvacrol e timol podem interferir no transporte de elétrons, absorção de nutrientes, síntese de ácidos nucleicos e também interagir com proteínas da membrana, causando deformação e prejudicando sua funcionalidade (BAJPAI et al., 2008). A atividade inibitória dos óleos essenciais pode estar relacionada à composição química, configuração estrutural e funcional das moléculas e possíveis interações sinérgicas entre os componentes identificados (DORMAN; DEANS, 2000).

A constante exposição das bactérias em biofilme a concentrações subletais de agentes detergentes/sanitizantes durante os procedimentos de higienização pode ativar os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse das bactérias, fazendo com que elas sobrevivam em condições ambientais inóspitas.

Dessa forma, foi avaliada a adaptação de *S. Enteritidis* à concentração subletal dos óleos e compostos. Os resultados obtidos mostraram que o microrganismo adaptou-se às variadas concentrações, pois foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as condições de adaptação e biofilme (Tabela 5). É possível observar que foram necessárias concentrações muito maiores de soluções para inibir o desenvolvimento do biofilme formado por *S. Enteritidis* em concentrações subletais dos óleos e compostos, evidenciando a adaptação e o aumento da tolerância do microrganismo aos antimicrobianos quando exposto a condições não ideais para sua eliminação.

Tabela 5 Comparação entre a atividade bactericida e a adaptação da *S. Enteritidis* à concentração subletal dos óleos essenciais e compostos.

Concentração	Valor-p ¹			
	Orégano	Tomilho	Timol	Carvacrol
2,00%	0,025*	1,000	1,000	1,000
2,50%	0,025*	0,025*	1,000	0,025*
3,00%	0,025*	0,025*	0,025*	0,025*
3,50%	0,114	0,114	0,025*	0,114
4,00%	0,114	0,114	0,025*	0,114
4,50%	1,000	1,000	0,114	1,000
5,00%	0,317	0,317	0,025*	0,317

¹ * Valores estatisticamente significativos nas diferentes concentrações comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $\alpha=0,05$

Estudos mostram que as bactérias possuem habilidades para aderir em superfícies variadas e formar biofilmes, fato que proporciona a esses microrganismos uma série de vantagens, como resistência a antibióticos e desinfetantes (TENOVER et al., 2004; TENOVER, 2006).

Em resposta a sinais ambientais de estresse, as salmonelas podem ativar reguladores, resultando no aumento e/ou diminuição da expressão de genes que geram resistência, permitindo que esses patógenos suportem variações de temperatura, pH, salinidade e sobrevivam em ambientes de processamento de alimentos. Essa adaptação também pode acarretar o acréscimo da virulência e a resistência a vários antimicrobianos (SPECTOR; KENYON, 2012).

Nas indústrias alimentícias, patógenos de origem alimentar são constantemente expostos a condições de estresses pela ineficácia dos procedimentos de desinfecção de equipamentos e utensílios, o que tem aumentado a resistência bacteriana, possibilitando a formação de biofilmes em presença de concentrações subletais de desinfetantes e ou sanitizantes (COSTERTON, 2005; STEENACKERS et al., 2012; BORGES et al., 2013).

Nguyen e Yuk (2013) avaliaram os variados fatores de resistência, como superfície de fixação, idade e exposição a diferentes valores de pH de biofilmes formados por *S. Typhimurium*, e constataram que a idade do biofilme é um fator

que contribui para a resposta adaptativa a sanitizantes industriais. Portanto, é essencial que se realize a desinfecção adequada dos ambientes de processamento de alimentos nas etapas iniciais de formação dos biofilmes.

4 CONCLUSÃO

As soluções apresentaram atividade bactericida contra as bactérias planctônicas e sésseis. O carvacrol a 0,25% (v/v) foi mais eficaz em células planctônicas, o biofilme foi mais sensível à solução de orégano a 2,0% (v/v) e foi observada adaptação da bactéria a concentração subletal para todos os tratamentos ($p < 0,05$). As soluções de óleos essenciais e compostos estudadas podem ser consideradas alternativas no desenvolvimento de sanitizantes utilizados em indústrias de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADUKWU, E. C.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1365-2672, 2012.
- BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; DUNG, N. T.; NUH, M. K.; KANG, S. C. In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 6, p. 314-320, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M.R.; CHAMBERLAIN, A. H. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4543-4548, Oct. 1999.
- BEER, D. de; SRINIVASAN, R.; STEWART, P.S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4339-4344, Dec. 1994.
- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 4, 2013.
- CASTELIJN, G. A. A.; PARABIRSING, J. A.; ZWIETERING, M. H.; MOEZELAAR, R.; ABEE, T. Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. **Veterinary Microbiology**. v. 161, p. 305-314, 2013.
- CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, v. 18, p. 1914-1920, 2002.
- CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 123-127, 2001.

COSTERTON, J. W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 437, p. 7-11, Aug. 2005.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.308-316, 2000.

GILBERT, E. S.; KHLEBNIKOV, A.; COWAN, S. E.; KEASLING, J. D. Analysis of biofilm structure and gene expression using fluorescence dual labeling. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1180-1182, 2001.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATSOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during re-refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 175–180, 2010.

GÜNDÜZ, G. T.; GÖNÜL, S. A.; KARAPINAR, M. Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 38-44, 2010a.

GÜNDÜZ, G. T.; GÖNÜL, S. A.; KARAPINAR, M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella* typhimurium on lettuce. **Food Control**, v. 21, p. 513-517, 2010b.

KHANJARI, A.; KARABAGIAS, I. K.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. **LWT – Food Science and Technology**, v. 53, p. 94-99, 2013.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 85, p. 633-640, 2004.

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

MAH, T.H.C.; TOOLE, G.A.O'. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, Japan, v. 9, p. 34-38, 2001.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the finnish *Salmonella* control. **Food Control**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 669-675, 2005.

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; TOOLE, G. A. O'. Growing and Analyzing Static Biofilms. *Current Protocols in Microbiology*. 1B.1.1-1B.1.17, 2005.

MILLEZI, A. F. Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2012. 112 p. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2012.

MORCK, D. W.; OLSON, M. E.; CERI, H. Microbial biofilms: preservation, control and removal. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Desinfection, sterilization and preservation**. Lippincott: Williams & Wilkins, p. 675-681, 2001.

MOR-MUR, M; YUSTE, J. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 24-35, 2010.

NGUYEN, H. D. N.; YUK, H. G. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. **Food Control**, v. 29, p. 236-240, 2013.

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

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549-543, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; NASCIMENTO, J. A.; BATISTA, N. N.; PICCOLI, R. H. *Cinnamon* essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. **European Food Research & Technology** (Print), v. 234, p. 821-832, 2012a.

OLIVEIRA, M. M. M.; PICCOLI, R. H.; NASCIMENTO, J. A.; BRUGNERA, D. F. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 809-818, 2012b.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May. 2007.

PASQUA, R. D.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 4863-4870, 2007.

PASQUA, R. D.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, p. 1040-1049, 2010.

PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, p. 467-495, 2004.

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.

SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente à *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136-141, 2010.

SPECTOR, M. P.; KENYON, W. J. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. **Food Research International**, v. 45, p. 455-481, 2012.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J.; *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of

staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**. v. 40, p. 175-179, 2000.

TENOVER, F. C.; WEIGEL, L. M.; APPELBAUM, P. C. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v. 48, n. 1, p. 275-280, 2004.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, New York, v. 119, p. 3-10, 2006.

TOOLE G. O'; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1561-1568, 2002.

VALERIANO, C.; OLIVEIRA, T. L. C.; CARVALHO, S. M.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enteric* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 673-677, 2012.

VESTBY, L. K.; MORETRO, T.; BALANCE, S.; LANGSRUD, S.; NESSE, L. L. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. **BMC Veterinary Research**, p. 5-20, 2009.

CAPÍTULO 3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium

RESUMO

Diversas bactérias são capazes de formar biofilme em superfícies, utensílios e equipamentos de indústrias de alimentos, dentre elas destacam-se as bactérias do gênero *Salmonella* spp. Esses microrganismos têm mostrado muita resistência aos antimicrobianos, fato que tem diminuído a eficácia dos desinfetantes empregados nos programas de limpeza e sanitização. Os óleos essenciais e seus compostos possuem potencial antimicrobiano para atuarem no controle de bactérias planctônicas e sésseis. Este estudo teve como objetivos avaliar a atividade bactericida das soluções dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano) e seus compostos timol e carvacrol sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* Typhimurium e a resposta adaptativa das bactérias à concentração subletal das soluções e sua capacidade de formação de biofilme em microplacas de poliestireno. As soluções apresentaram atividade bactericida contra as bactérias planctônicas e sésseis, porém foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,05$). A solução de tomilho a 0,25% (v/v) foi mais eficaz em células planctônicas e o biofilme foi mais sensível às soluções de tomilho e carvacrol a 2,5% (v/v). Foi observada adaptação às soluções de carvacrol, orégano e timol ($p < 0,05$). O biofilme formado pela bactéria não se adaptou à concentração subletal da solução de tomilho. Conclui-se que a solução de tomilho seria a alternativa mais eficaz no controle do biofilme de *S. Typhimurium* que mesmo submetido à concentração subletal da solução teve seu desenvolvimento interrompido com a concentração de 3,0% (v/v). As soluções de óleos essenciais e seus compostos majoritários podem representar uma alternativa eficiente no controle de biofilmes em indústrias de alimentos.

Palavras-chaves: Biofilme. Óleos essenciais. Sanitizantes. Concentração subletal

ABSTRACT

Several bacteria are capable of forming biofilms on surfaces and utensils in the food industry, among them there are *Salmonella* spp. bacteria. These microorganisms have shown a lot of resistance to antimicrobial agents, a fact that has diminished the effectiveness of disinfectants used in cleaning and sanitizing programs. Essential oils and their compounds have antimicrobial potential in the control of planktonic and sessile bacteria. This study aimed to evaluate the bactericidal activity of essential oil solutions of *Thymus vulgaris* (thyme), *Origanum vulgare* (oregano) and its compounds carvacrol and thymol on planktonic and sessile cells of *Salmonella enterica* Typhimurium including the adaptive response of bacteria to sub-lethal concentration solutions and their ability to form biofilm on polystyrene microplates. The solutions showed bactericidal activity against planktonic and sessile bacteria, but significant differences were found between concentrations ($p < 0.05$). The thyme solution 0.25% (v/v) was more effective in biofilm and planktonic cells were more sensitive to thyme and carvacrol solutions of 2.5% (v/v). Adaptation was observed with solutions of carvacrol, thymol and oregano ($p < 0.05$). The biofilm formed by the bacterium did not adapt to sub-lethal concentration of thyme solution. Thyme would be the most effective alternative for the control of *S. Typhimurium* biofilms hence subjected to sub-lethal concentration of the solution had their development stopped at the concentration of 3.0% (v/v). Essential oil solutions and essential oil compound solutions may represent an effective alternative for the control of biofilms in food industry.

Key-words: Biofilm. Essential oils. Sanitizers. Sublethal concentration.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias *Salmonella* spp. são patógenos de abrangência mundial e têm sido apontadas como alguns dos principais agentes identificados em surtos de toxinfecções alimentares. As contaminações provocadas por esses microrganismos podem trazer grandes prejuízos ao setor alimentício. Dentre os sorotipos, a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* Typhimurium, é um dos mais frequentes nos surtos de salmonelose registrados (YUSTE; MOR-MUR, 2010).

Atualmente, uma das grandes preocupações do mercado mundial é o aparecimento de sorotipos multirresistentes a antibióticos e sanitizantes - fato que tem diminuído a eficácia dos desinfetantes empregados nos programas de limpeza e sanitização (BURMOLLE et al., 2010; STEENACKERS et al., 2012). Dessa forma, o estabelecimento de medidas de controle sanitário, limpeza e sanitização podem evitar perdas econômicas através de embargos e impostos estabelecidos pelos países importadores (SHINOHARA et al., 2008).

Salmonella spp. possui grande habilidade para formar biofilme em superfícies, utensílios e equipamentos de indústrias de alimentos (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013; AUSTIN et al., 1998; ORTEGA et al., 2009; HOOD; ZOOTOLO, 1995; VESTBY et al., 2009; STEENACKERS et al., 2012). Devido às dificuldades em se controlar o desenvolvimento de biofilmes formados por *Salmonella* spp. e outros microrganismos, as indústrias alimentícias têm buscado novos produtos com princípios ativos que possuam ação sanitizante, que sejam mais eficazes e menos tóxicos aos humanos.

Nesse contexto, os óleos essenciais destacam-se por apresentarem elevada atividade antimicrobiana, e, em concentrações adequadas, “geralmente são reconhecidos como seguros” (GRAS). Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho) contêm, dentre outros

compostos, o timol e o carvacrol, que são considerados potentes bactericidas e fungicidas (BADI et al., 2004; LORENZINI; MATOS, 2002).

Diante do exposto, a pesquisa buscou avaliar a ação sanificante dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* e seus compostos timol e carvacrol sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella* Typhimurium e a resposta adaptativa desses biofilmes à concentrações subletais das referidas substâncias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais e compostos majoritários

Os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Thymus vulgaris* (tomilho branco) foram adquiridos na Ferquima Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). Os componentes majoritários dos óleos essenciais, conforme especificado pelo fornecedor, para o óleo de orégano foram: carvacrol (71%), γ -terpineno (4,5%), β -cariofileno (4,0%); p-cimeno (3,5%), timol (3,0%), e para o óleo essencial de tomilho: timol (47,3%), p-cimeno (26,8%), γ -terpineno (6,0%), linalol (5,2%), carvacrol (3,1%), α -pineno (2,2%), mirceno (1,4%), 1,8-cineol (1,3%), borneol (0,9%), canfeno (0,8%) e β -cariofileno (0,8%). Os compostos timol (99,5% de pureza) e carvacrol (98% de pureza) foram adquiridos na Sigma-Aldrich.

2.2 Microrganismo, estocagem e padronização do inóculo

A bactéria utilizada foi *Salmonella enterica* subespécie *enterica* Typhimurium S190 doada pelo LABENT (Laboratório de Enterobactérias) da FIOCRUZ. A cultura estoque foi armazenada em meio de congelamento (glicerol - 15 mL; peptona bacteriológica - 0,5 g; extrato de levedura - 0,3 g; NaCl - 0,5 g; água destilada 100 mL, pH 7,0). A cultura foi descongelada à temperatura ambiente e reativada inoculando-se alíquotas de 100 μ L em tubos contendo 10 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C/24h. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação, alíquota de 50 μ L do inóculo foi transferida para 300 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubada a 37°C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro (D.O.600 nm) e plaqueamento

em Agar Triptona de Soja (TSA) com incubação a 37°C/24h. A cultura foi padronizada em 10⁸ UFC mL⁻¹

2.3 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) das células planctônicas

A concentração mínima bactericida dos óleos essenciais e de seus compostos majoritários, timol e carvacrol, foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com adaptações.

Para tanto, soluções de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e de óleos essenciais e os compostos foram obtidas nas seguintes concentrações (%): 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50 e 1,00 (v/v). Foram adicionadas nas cavidades 150 µL e inoculadas 10 µL da cultura padronizada. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h e determinada a concentração do óleo essencial e do composto capaz de matar as células de *Salmonella* Typhimurium, determinando-se, assim, a mínima concentração bactericida do óleo essencial ou composto testado.

O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições e utilizados dois controles para cada óleo essencial e composto testados; sendo um controle negativo, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e óleo essencial ou seus compostos e um controle positivo, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e inóculo.

2.4 Formação de biofilme em microplaca

Os biofilmes de *S. Enteritidis* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 µL de cultura padronizada em

150 μL de TSB e incubação a 37°C/48h. Após esse período a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%) para remoção das células não aderidas. Para o controle negativo foram adicionados nas cavidades 200 μL de TSB. Solução de cristal violeta (0,1% m/v) foi adicionada no volume de 200 μL em cada cavidade já lavada. Após 10 minutos de contato, o cristal violeta foi cuidadosamente retirado e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina. Os biofilmes, visíveis como anéis corados nas paredes das cavidades, foram desprendidos após secagem das placas ao ar, pela adição de 200 μL de etanol 95% (v/v). Após 10 minutos, o conteúdo das cavidades foi homogeneizado e transferido para novas cavidades de nova microplaca. A quantidade de cristal violeta presente na fase líquida foi avaliada medindo-se a absorbância a 600 nm em leitor de microplaca (Anthos 2010) (adaptado de MERRITTI; KADOURI; TOOLE, 2005). Para determinar a capacidade de formação de biofilme, foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn < Doa \leq 2 \times Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \times Docn < Doa$). Onde Doa foi a densidade óptica do biofilme e Docn foi 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.

2.5 Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB)

Os biofilmes de *S. Typhimurium* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 μL de cultura padronizada em 150 μL de TSB e incubação a 37°C/48h. Após esse período a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%)

para remoção das células não aderidas. Os óleos essenciais e seus compostos foram adicionados às cavidades em diferentes concentrações. As soluções foram preparadas em água destilada estéril acrescentada de 0,5% de Tween 80 e homogeneizadas por agitação vigorosa em vórtex por 2 minutos. Foram utilizadas as seguintes concentrações (%) (v/v): 0,00; 0,01; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50 e 5,00. Alíquotas de 200 µL das soluções de óleos essenciais ou seus compostos foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de contato as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%). Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h e determinada as concentrações de óleos essenciais e dos compostos capazes de matar o biofilme, sendo essa considerada a Concentração Mínima Bactericida do Biofilme. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições

2.6 Determinação da adaptação do biofilme de *Salmonella Typhimurium* à concentrações subletais das soluções de óleos essenciais e compostos

A adaptação de *S. Enteritidis* à concentrações subletais dos óleos essenciais e seus compostos foi realizada. Para determinação das concentrações subletais dos óleos essenciais e seus compostos, foram realizados testes e observação do crescimento dos microrganismos em concentrações reduzidas daquelas reveladas como bactericidas. Os testes com ¼ da CMB do biofilme inibiu o crescimento de todas as células, então foram realizados outros testes para determinação da concentração máxima subletal (CMS) que permite o crescimento do microrganismo (PASQUA et al., 2010). Dessa forma, definiu-se ¼ da CMB das células planctônicas como a quantidade ideal para as concentrações subletais das soluções estudadas. Soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e óleos

essenciais e seus compostos nas concentrações subletais: tomilho (0,06%), timol (0,12%), orégano (0,12%) e carvacrol (0,12%) foram adicionadas no volume de 150 μL nas cavidades e inoculados 50 μL da cultura padronizadas. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C/48h. Após esse período, foram realizados simultaneamente dois testes:

2.6.1 Atividade anti-biofilme dos óleos essenciais e seus compostos

Após o cultivo das células e possível formação de biofilme, a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%) para remoção das células não aderidas. A capacidade de formação de biofilme pelas células cultivadas em concentrações subletais nas cavidades de poliestireno foi então determinada como descrito no item 2.5 e a classificação conforme sugerido por Stepanovic et al. (2000), sendo os valores obtidos comparados com o desenvolvimento dos biofilmes sem adição dos óleos ou seus compostos.

2.6.2 Determinação da concentração mínima bactericida

Após formação de biofilme como descrito no item 2.5, a cultura foi removida e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%) para remoção das células não aderidas. Os óleos essenciais e seus compostos foram adicionados às cavidades em diferentes concentrações. As soluções foram preparadas em água destilada estéril acrescentada de 0,5% de Tween 80 e homogeneizadas por agitação vigorosa em vórtex por 2 minutos. Foram utilizadas as seguintes concentrações (% v/v): 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 6,0. As soluções de óleos essenciais foram adicionadas no volume de 200 μL às cavidades. Para cada concentração foram feitas triplicatas. Após 20 minutos de

contato as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução salina (0,85%). Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h e determinada as concentrações de óleos essenciais e dos compostos capazes de matar o biofilme. A adaptação das células em biofilme à concentração subletal das soluções de óleos essenciais e compostos foi verificada pela comparação entre os valores de concentração mínima bactericida determinada para biofilme antes e depois da adaptação. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições

2.7 Análises estatísticas

Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se o valor-p $\leq 0,05$. Para a análise dos dados utilizou-se o programa SPSS 19.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As soluções de óleos essenciais de orégano e tomilho e dos compostos timol e carvacrol apresentaram atividade bactericida sobre *S. Typhimurium*. Na Tabela 1, observa-se que a bactéria foi mais sensível à solução de óleo essencial de tomilho a 0,25% (v/v). As soluções de orégano, timol e carvacrol foram capazes de eliminar as células planctônicas à concentração de 0,50% (v/v).

Tabela 1 Concentração Mínima Bactericida das soluções dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre células planctônicas de *S. Typhimurium*

Concentração (% v/v)	Orégano	Tomilho	Timol	Carvacrol	Valor de p ¹
0,00	-	-	-	-	1,000
0,01	-	-	-	-	1,000
0,03	-	-	-	-	1,000
0,06	-	-	-	-	1,000
0,12	-	-	-	-	1,000
0,25	-	+	-	-	0,012
0,50	+	+	+	+	0,012
1,00	+	+	+	+	1,000

¹As diferentes concentrações foram comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $\alpha = 0,05$; (-) não bactericida (+) bactericida

Kokkini et al. (1997) estudaram os óleos essenciais de tomilho e orégano e classificaram o timol e o carvacrol como seus componentes mais ativos, mesmo que estes possam ser encontrados em concentrações distintas em óleos extraídos da mesma espécie de planta, por variações de cultivo, temperatura, época de colheita e estocagem.

Khanjari, Karabagias e Kontominas (2013) relataram que os terpenos timol e carvacrol possuem amplo espectro contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos, embora alguns trabalhos evidenciam que os compostos γ -terpineno e p-cimeno foram considerados efetivos e apresentaram atividade

bactericida contra alguns microrganismos (CONSENTINO et al., 1999; TABANCA et al., 2001; PATTNAIK et al., 1996).

Estudos mostram que as propriedades bactericidas de um óleo essencial podem ser atribuídas, dentre outros fatores, à presença de seus compostos majoritários ou a sinergia entre esses e os compostos minoritários identificados no óleo essencial (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008).

Abdollahzadeh, Rezaei e Hosseini (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho sobre *Listeria monocytogenes*. Como resultado, observaram redução das células viáveis da bactéria à concentração de 0,40% do óleo e correlacionaram a alta atividade antimicrobiana aos compostos fenólicos presentes nesse óleo essencial.

A capacidade de formação de biofilme por *S. Typhimurium* em concentração subletal dos óleos essenciais e compostos foi avaliada através dos valores de absorbâncias do crescimento bacteriano em concentração subletal (1/4 da CMB - concentração capaz de inibir completamente o crescimento das células planctônicas) e comparada aos valores encontrados para o biofilme formado em meio de cultura sem a adição de nenhum componente. Os resultados mostraram que houve a formação de biofilme em todas as concentrações (Tabela 2).

Os resultados evidenciaram que *S. Typhimurium*, por meio da determinação e comparação dos valores de Doa e Docn, foi considerada uma bactéria “fortemente formadora de biofilme”. Leary et al. (2013) avaliaram a capacidade de formação de biofilme em diferentes superfícies por *S. Typhimurium*, e os resultados foram similares aos encontrados neste estudo - as bactérias mostraram grande habilidade para se organizarem em biofilmes quando aderidas em superfícies de plástico e aço inoxidável.

Tabela 2 Capacidade de formação de biofilme de *S. Typhimurium* crescidas em presença de concentração subletal dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol em placas de poliestireno.

Tratamento	DOA	DOCN	Formação de biofilme
Sem óleo	0,294±0,021	0,068±0,002	FFB
orégano (0,12%)	0,305±0,026	0,068±0,002	FFB
tomilho (0,06%)	0,287±0,031	0,068±0,002	FFB
timol (0,12%)	0,296±0,031	0,068±0,002	FFB
carvacrol (0,12%)	0,347±0,028	0,068±0,002	FFB

Não Formadora de Biofilme - NF ($Doa \leq Docn$), Fracamente Formadora de Biofilme - FF ($Docn < Doa \leq 2 \times Docn$), Moderadamente Formadora de Biofilme - MF ($2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$) e Fortemente Formadora de Biofilme - FFB ($4 \times Docn < Doa$). Onde Doa é a densidade óptica do biofilme e Docn é a densidade óptica do controle de crescimento negativo (STEPANOVIĆ et al., 2000)

O biofilme formado em placas de poliestireno foi testado nas mesmas concentrações capazes de inibir o desenvolvimento das células planctônicas, e não foi notada nenhuma atividade bactericida, o que afirma o comportamento diferenciado dessas células quando em biofilmes (Tabela 3).

Tabela 3 Concentração Mínima Bactericida das soluções dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre biofilme de *S. Typhimurium*.

Concentração (% v/v)	Óleo essencial				Valor de p^1
	Orégano	Tomilho	Timol	Carvacrol	
Biofilme					
0,00	-	-	-	-	1,000
0,01	-	-	-	-	1,000
0,03	-	-	-	-	1,000
0,06	-	-	-	-	1,000
0,12	-	-	-	-	1,000
0,25	-	-	-	-	1,000
0,50	-	-	-	-	1,000
1,00	-	-	-	-	1,000
6,00	+	+	+	+	0,748

¹ As diferentes concentrações foram comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$; (-) não bactericida (+) bactericida

Para Morck, Olson e Ceri (2001), as células organizadas em biofilme passam a apresentar vantagens em relação às células em seu estado planctônico

por terem maiores condições de sobrevivência e menores chances de erradicação.

Entre os óleos essenciais e compostos testados sobre o biofilme formado por *S. Typhimurium*, em concentrações mais elevadas que aquelas testadas para células planctônicas, foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações ($p < 0,05$). A maior sensibilidade foi atribuída às soluções tomilho e carvacrol a 2,5% (v/v), seguida da capacidade bactericida da solução de orégano a 3,0% (v/v). A solução de timol a 5,0% (v/v) foi a menos eficaz no controle do biofilme (Tabela 4).

Tabela 4 Concentração Mínima Bactericida das soluções dos óleos essenciais de orégano, tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre biofilme de *S. Typhimurium* e adaptação da bactéria à concentração subletal das soluções.

Concentração (% v/v)	Óleo essencial				Valor de p ¹
	Orégano	Tomilho	Timol	Carvacrol	
Biofilme					
2,00	-	-	-	-	1,000
2,50	-	+	-	+	0,012
3,00	+	+	-	+	0,012
3,50	+	+	-	+	0,012
4,00	+	+	-	+	0,012
4,50	+	+	-	+	0,012
5,00	+	+	+	+	1,000
Adaptação					
2,00	-	-	-	-	0,392
2,50	-	-	-	-	0,392
3,00	-	+	-	-	0,012
3,50	-	+	-	-	0,012
4,00	-	+	-	-	0,041
4,50	-	+	-	-	0,300
5,00	-	+	-	+	0,037
6,00	+	+	+	+	0,748

¹ As diferentes concentrações foram comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $p < 0,05$; (-) não bactericida (+) bactericida

Knowles et al. (2005) avaliaram a ação antimicrobiana do carvacrol em diferentes estágios do biofilme multiespécie desenvolvido por *S. aureus* e *S. Typhimurium* e observaram redução no número de células de *S. aureus* cerca de 2,5 Log UFC durante os primeiros estágios de formação, causando diminuição significativa da população no biofilme maduro e redução de 3 Log UFC do biofilme de *Salmonella Typhimurium*.

Para Ceylan e Fung (2004), a presença do grupo hidroxila nos monoterpenos está relacionada com a inativação das enzimas microbianas. O grupo pode interagir com a membrana celular e provocar extravasamento dos componentes celulares pela membrana.

O timol (4-isopropil-2-metilfenol) e o carvacrol (2-isopropil-5-metilfenol) são isômeros, diferenciando-se apenas pela posição do grupo hidroxila (SOLOMONS; FRYLHE, 2005). Esta diferença nas posições altera a reatividade de um composto em relação ao outro, uma vez que a maioria das reações com estes compostos deve ocorrer pelo ataque do grupo hidroxila. Possivelmente, no carvacrol, o impedimento estérico realizado pelo metil é muito menor do que aquele que o propil efetua no timol, devido ao seu tamanho e quantidade de átomos presentes. No metil, observa-se apenas um carbono e três hidrogênios para dificultar o “ataque” ao grupo hidroxila. Já no timol, o propil disponibiliza três carbonos e sete hidrogênios para a mesma ação. O comportamento dessas moléculas pode explicar a melhor atuação da solução de carvacrol à concentração de 2,5% (v/v) em relação aos resultados encontrados para timol sobre o biofilme formado por *S. Typhimurium*, uma vez que inibiu totalmente a formação de biofilme. Para a solução de timol, foi necessária uma concentração bem mais elevada - a atividade bactericida foi observada somente a 5,0% (v/v).

A constante exposição das bactérias em biofilme a concentrações subletais de agentes detergentes/sanificantes durante os procedimentos de

higienização pode ativar os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse das bactérias, fazendo com que elas sobrevivam em condições ambientais inóspitas. Dessa forma, foi avaliada a resistência da *S. Typhimurium* à concentração subletal dos óleos e compostos. Observa-se, pela Tabela 5, que os resultados obtidos mostraram que o microrganismo adaptou-se às soluções de timol, orégano e carvacrol, pois foram encontradas diferenças significativas (valor<0,05) entre as condições de adaptação e biofilme.

Tabela 5 Comparação entre a atividade bactericida e a adaptação da *S. Typhimurium* à concentração subletal dos óleos essenciais e compostos.

Concentração	Valor-p ¹			
	Orégano	Tomilho	Timol	Carvacrol
2,00%	1,000	0,317	1,000	1,000
2,50%	1,000	0,114	1,000	0,025*
3,00%	0,025*	1,000	1,000	0,025*
3,50%	0,025*	1,000	1,000	0,025*
4,00%	0,025*	1,000	1,000	0,114
4,50%	0,114	1,000	0,317	0,114
5,00%	0,025*	0,317	0,025*	1,000

¹* Valores estatisticamente significativos nas diferentes concentrações comparadas pelo Teste de Kruskal-Wallis $\alpha=0,05$

Os resultados revelaram que o óleo essencial de tomilho não apresentou diferença significativa entre biofilme e adaptação às concentrações subletais, o que leva a concluir que essa solução seria alternativa eficaz no controle da bactéria *S. Typhimurium*, que, mesmo submetida à concentração subletal da solução de tomilho, teve seu desenvolvimento inibido quando exposto à concentração de 3,0% (v/v). Observou-se que, para as outras soluções (orégano, timol e carvacrol), foram necessárias concentrações muito maiores para inibir o desenvolvimento de biofilme por *S. Typhimurium*. Esses resultados podem ser atribuídos ao sinergismo entre os compostos encontrados no óleo essencial de tomilho.

Szczepanski e Lipski (2014) avaliaram os óleos essenciais de tomilho e orégano sobre bactérias gram-negativas e encontraram resultados similares, onde o óleo essencial de tomilho foi mais eficaz que o óleo essencial de orégano, sendo capaz de inibir o desenvolvimento de biofilme em concentrações subletais a 0,001% (v/v).

Estudos mostram que bactérias gram-negativas, como *S. Typhimurium*, são mais resistentes que as gram-positivas, pois a membrana externa dificulta a difusão dos constituintes do óleo na célula bacteriana (BURT, 2004).

Nas células bacterianas, o mecanismo de ação desses compostos provoca danos estruturais e funcionais à membrana plasmática (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994; BAKKALI et al., 2008). A permeabilidade da membrana da célula pode ser influenciada pela sua composição e hidrofobicidade dos compostos que a atravessam. Como os óleos essenciais são tipicamente lipofílicos, tendem a se acumular na bicamada lipídica, determinando, dessa forma, a permeabilidade da estrutura (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). O caráter hidrofóbico dos óleos essenciais provoca alteração na estrutura do envelope celular, e os compostos fenólicos, como timol, carvacrol e eugenol, diminuem a fluidez e alteram o perfil lipídico da membrana celular bacteriana (PASQUA et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

As soluções apresentaram atividade bactericida contra as bactérias planctônicas e sésseis. A solução de tomilho a 0,25% (v/v) foi mais eficaz em células planctônicas, e o biofilme foi mais sensível às soluções de tomilho e carvacrol a 2,5% (v/v). Foi observada adaptação às soluções de carvacrol, orégano e timol ($p < 0,05$). O biofilme formado pela bactéria não se adaptou à concentração subletal de tomilho. Conclui-se que a solução de tomilho seria uma alternativa eficaz no controle do biofilme de *S. Typhimurium* que, mesmo submetido à concentração subletal da solução, teve seu desenvolvimento interrompido com a concentração de 3,0% (v/v).

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, p. 177-183, 2014.

AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KAY, W. W.; COLLINSON, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 295-301, May 1998.

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products an international Journal**, v. 19. p. 231-236, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BURMOLLE, M.; THOMSEN, T. R.; FAZLI, M.; DIGE, I.; CHRISTENSEN, L.; HOMOE, P. Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity-mono-species biofilms in multi-species infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 324-336, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial Activity of Spices. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 12, p.1-55, May 2004

CONSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZED, E.; PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus vulgaris* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n.2, p. 130-135, Aug. 1999.

DORMAN, H. J. D; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. v. 88, p. 308–316, 2000.

FUENTE-NÚÑES, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, E. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 580-589, 2013.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.

KHANJARI, A.; KARABAGIAS, I. K.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. **LWT – Food Science and Technology**, v. 53, p. 94-99, 2013.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803, Feb. 2005.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; DARDIOTI, A.; KRIGAS, N.; LANARAS, T. Autumn essential oils of Greek oregano. **Phytochemistry**, v. 44, p. 883-886, 1997.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LEARY, D. O’; MCCABE, E. M.; MCCUSKER, M. P.; MARTINS, M.; FANNING, S. DUFFY, G. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. **International Journal of Food Microbiology**, v.161, p.36-43, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil**: nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; TOOLE, G. A. O’. Growing and Analyzing Static Biofilms. **Current Protocols in Microbiology**. 1B.1.1-1B.1.17, 2005.

MORCK, D. W.; OLSON, M. E.; CERI, H. Microbial biofilms: preservation, control and removal. In: BLOCK, S.S. (Ed.). **Desinfection, sterilization and preservation**. Lippincott: Williams & Wilkins, p. 675-681, 2001.

MOR-MUR, M; YUSTE, J. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 24-35, 2010.

ORTEGA, M. B.; HAGIWARA, T.; WATANABE, H.; SAKYUAMA, T. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 573-578, Apr. 2009.

PASQUA, R. D.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, p. 4863-4870, 2007.

PASQUA, R. D.; MAMONE, G.; FERRANTI, P.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, p. 1040-1049, 2010.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, Cambridge, v. 89, n. 385, p. 39-46, 1996.

SHINOHARA, N. K. S.; BEZERRA, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L. M.; DUTRA, R. A. F.; LIMA, J. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

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.

SOLOMONS, T. W.; FRYLHE, C. B. **Química Orgânica**. LTC, 8 ed., v. 1, 2005.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S.C.J.; *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D., DAKIC, I., SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**. v. 40, p. 175-179, 2000.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v. 36, p. 224-229, 2014.

TABANCA, N.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; BASER, K. H. C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Micromeria cristata* subsp. *Phygia* and the enantiomeric distribution of borneol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4300-4303, Sept. 2001.

VESTBY, L. K.; MORETRO, T.; BALANCE, S.; LANGSRUD, S.; NESSE, L. L. Survival potential of wild type cellulose deficient *Salmonella* from the feed industry. **BMC Veterinary Research**, p. 5-20, 2009.