



DANILA SOARES CAIXETA

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Curcuma longa* L. E *Bixa orellana* L. SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* E *Listeria monocytogenes*
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS EM
POLIPROPILENO**

LAVRAS – MG

2010

DANILA SOARES CAIXETA

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Curcuma longa* L. E *Bixa orellana* L.
SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* E *Listeria monocytogenes*
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS EM POLIPROPILENO**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Co-Orientadores

Dr. Eduardo Alves

Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS - MG
2010**

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

Caixeta, Danila Soares.

Ação de óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* planctônicas e sésseis em polipropileno / Danila Soares Caixeta. – Lavras : UFLA, 2010.

127 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Bactérias patogênicas. 2. Açafrão. 3. Urucum. 4. Biofilme. 5. Composição química. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

DANILA SOARES CAIXETA

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Curcuma longa* L. E *Bixa orellana* L.
SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* E *Listeria monocytogenes*
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS EM POLIPROPILENO**

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

APROVADA em 20 de outubro de 2010.

Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNICOR
Dra. Carolina Valeriano	UFLA
Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Dra. Simone Cristina Marques	UFLA

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

Dr. Eduardo Alves
Dra. Maria das Graças Cardoso
Co-Orientadores

LAVRAS – MG

2010

Aos meus pais, Omar e Dorinha.
Aos meus irmãos, Fernando e Thiago.
Ao meu noivo, Frederico

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela dávida do saber.

Aos meus pais, Omar e Dorinha, fonte inesgotável de amor, motivação e estímulo, e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus irmãos, Fernando e Thiago, e minhas cunhadas, Minéia e Alessandra, por sempre acreditarem em minha capacidade de superar desafios.

Aos meus sobrinhos, Isabella e Otávio, pela infinita alegria que me proporcionam.

Ao meu amado noivo, Frederico, que, sem medir esforços, sempre esteve ao meu lado e por me fazer acreditar que um sonho jamais pode apagar.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade.

Ao CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli agradeço pela orientação, o incentivo, a confiança depositada, a disponibilidade e apoio ao longo de todo o trabalho.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso e professor Dr. Eduardo Alves, pela co-orientação, pela atenção dispensada em todos os momentos em que foram solicitados e, também, pela colaboração e sugestões para a realização deste trabalho.

Aos produtores Arlindo Vaz e Joaquim Paulo Soares pelo fornecimento das folhas de açafrão e urucum, que muito contribuíram para a boa execução desse trabalho.

À Dra. Marilda Caixeta e ao Dr. João Batista Vida, por contribuírem significativamente para realização dessa etapa importante em minha vida.

Aos professores, colegas e funcionários do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela confiança e amizade.

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciência dos Alimentos pelo carinho dedicado, disponibilização de materiais e das instalações.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Química, agradeço pelo trabalho e tempo despendidos para extração dos óleos essenciais.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Microscopia e Análise Ultra-Estrutural - em especial ao Douglas, Cláudia e Eloísa - agradeço pelos ensinamentos, ajuda e compreensão.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, tenho a agradecer o companheirismo nos bons e maus momentos, o agradável convívio, a amizade partilhada e toda a ajuda dispensada.

Quero expressar os meus melhores agradecimentos e o meu profundo reconhecimento a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste trabalho.

“O papel dos infinitamente pequenos é infinitamente grande”.

Louis Pasteur

RESUMO

Biofilme é uma comunidade sésil de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica extracelular, que eles mesmos produzem, caracterizada por células aderidas irreversivelmente em um substrato ou interface e que exibem alteração fenotípica em relação ao crescimento e transcrição de genes. Grande diversidade de microrganismos é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies tais como aço inoxidável, vidro, polietileno de baixa densidade, ferro fundido, borracha, policarbonato e polipropileno apresentando certas vantagens quando comparadas a células planctônicas, incluindo resistência a antimicrobianos. A erradicação normalmente requer o uso de sanificantes ácidos, alcalinos e/ou iodóforos, no entanto, algumas questões têm sido levantadas sobre a segurança de químicos sintéticos, especialmente aqueles aplicados à indústria de alimentos e, diante disso, a aplicação de produtos naturais, como óleos essenciais, tem ganhado considerável atenção. Este estudo teve como objetivos identificar e quantificar os componentes químicos de óleos essenciais de folhas secas de *Curcuma longa* L. (Açafrão) e *Bixa orellana* L. (Urucum); determinar a concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de açafrão, urucum e sinergismo sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; avaliar o potencial de formação de biofilme das bactérias *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* em superfície de polipropileno, quando cultivadas em TSB; avaliar o potencial bactericida dos óleos essenciais de açafrão, urucum e sinergismo, no biofilme maduro e avaliar por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão aspectos morfológicos do biofilme maduro, bem como a ação dos óleos essenciais sobre células planctônicas.

Palavras-chave: Biofilme. Bactérias. Açafrão. Urucum.

ABSTRACT

Biofilm is a community of sessile microorganisms embedded in an extracellular polymeric matrix that they, themselves, produce. The matrix is characterized by cells irreversibly adhered in a substrate or interface, and exhibits phenotypic alteration in relation to the growth and transcription of genes. A large diversity of microorganisms are capable of adhering and form biofilm on surfaces as stainless steel, glass, low density polyethylene, cast iron, rubber, polycarbonate and polypropylene; presenting certain advantages when compared to planktonic cells, including antimicrobial resistance. The eradication usually requires the use of acid, alkaline and/or iodophoric sanitizers, however, some questions have been raised about the safety of synthetic chemicals, especially those applied by the food industry. As a result, the application of natural products, such as essential oils, has been gaining considerable attention. This study aimed to identify and to quantify the chemical components of essential oils of dry leaves of *Curcuma longa* L. (turmeric) and *Bixa orellana* L. (annatto); to determine the minimum inhibitory concentration of the essential oils of turmeric, annatto and synergism on *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; to evaluate the biofilm formation potential of the bacteria *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* on polypropylene surface, when cultivated in TSB; to evaluate the bactericidal potential of the essential oils of turmeric, annatto and synergism, on the mature biofilm and to evaluate, by scanning and transmission electronic microscopy, morphological aspects of the mature biofilm, as well as the action of the essential oils on planktonic cells.

Keywords: Biofilm. Bacteria. Turmeric. Annatto.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Biofilmes microbianos.....	15
2.2	Composição do biofilme.....	16
2.2.1	Exopolissacarídeos (EPS).....	16
2.2.2	Microrganismos.....	18
2.2.2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2.2.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.3	Relevância dos biofilmes.....	24
2.4	Formação da comunidade microbiana.....	25
2.4.1	Fatores que influenciam na formação do biofilme.....	29
2.4.1.1	Propriedades físico-químicas das células.....	29
2.4.1.2	Fontes de nutrientes.....	31
2.4.1.3	Fatores ambientais.....	32
2.5	Superfícies envolvidas na formação do biofilme.....	34
2.6	Mecanismos de resistência das comunidades microbianas.....	36
2.7	Métodos para monitoramento do biofilme.....	38
2.7.1	Microscopia eletrônica.....	39
2.8	Controle do biofilme.....	41
2.8.1	Óleos essenciais.....	41
2.8.2	Biossíntese dos óleos essenciais.....	42
2.8.3	Aplicações dos óleos essenciais.....	44
2.8.3.1	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	45
2.8.4	Descrição botânica de vegetais produtores de óleos essenciais.....	47
2.8.4.1	<i>Curcuma longa</i> L. (Açafrão da Índia).....	47
2.8.4.2	<i>Bixa orellana</i> L. (Urucum).....	50
	REFERÊNCIAS	54
	CAPÍTULO 2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS DE <i>Curcuma longa</i> L. e <i>Bixa orellana</i> L SOBRE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E <i>Listeria monocytogenes</i>.....	70
1	INTRODUÇÃO.....	73
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
2.1	Matéria-prima e extração dos óleos essenciais.....	76
2.1.1	Identificação e quantificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais.....	77
2.2	Microrganismos padrões.....	78

2.2.1	Obtenção do inóculo.....	78
2.3	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	78
2.4	Avaliação da atuação dos óleos essenciais sobre os microrganismos por microscopia eletrônica de transmissão....	79
2.5	Análise estatística.....	80
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
3.1	Composição química dos óleos essenciais.....	81
3.2	Atividade antimicrobiana.....	84
4	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS	95
	CAPÍTULO 3 APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Curcuma longa</i> L. (AÇAFRÃO) E <i>Bixa orellana</i> L. (URUCUM) NO CONTROLE DE BIOFILME FORMADO POR <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853 EM SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO.....	99
1	INTRODUÇÃO.....	102
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	104
2.1	Microrganismos padrões.....	104
2.2	Higienização dos cupons.....	104
2.3	Adesão das células bacterianas.....	105
2.4	Enumeração das células em biofilme.....	105
2.5	Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a células sésseis.....	106
2.6	Microscopia eletrônica de varredura.....	106
2.7	Análise estatística.....	107
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
3.1	Crescimento de bactérias em TSB e formação de biofilme em superfície de polipropileno.....	108
3.2	Aplicação de óleos essenciais no controle de biofilme.....	115
4	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS	121
	APÊNDICES.....	126

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos de Antonie van Leuwenhoek, cientistas de várias áreas têm desenvolvido trabalhos sobre biofilmes, que correspondem a comunidades microbianas estruturadas aderidas em superfícies abióticas e/ou bióticas, constituídos principalmente de água e exopolissacarídeos (EPS), sendo que estes são produzidos pelos próprios microrganismos (COSTERTON, 1999).

A formação do biofilme é iniciada por processo reversível, em que células aderem à superfície condicionada; após iniciar a produção de exopolissacarídeo, crescimento populacional e divisão celular o processo torna-se irreversível; a formação completa do biofilme é caracterizada por uma comunidade bem estruturada denominada de clímax: nesse estágio ocorre o desprendimento de células individuais ou em aglomerados que colonizarão outras superfícies. O processo de formação do biofilme pode ser influenciado por fatores ambientais, genéticos e físicos, no entanto, quando estabelecido, pode causar tanto benefícios quanto malefícios ao homem e animais (PLOUX et al., 2007).

O controle da adesão inicial é crucial na inibição da formação do biofilme, para tal, é necessária a utilização de sanificantes adequados e eficientes, sejam eles químicos ou físicos. Recentemente, o uso de óleos essenciais no controle de biofilmes se intensificou, por apresentarem amplo espectro de ação sobre os microrganismos e por serem considerados seguros para serem aplicados em linhas de processamento de alimento.

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis ou etéreos, são produtos do metabólito secundário dos vegetais, sintetizados, estocados e liberados através de estruturas epidérmicas, glândulas secretoras e tricomas, encontradas em folhas, raízes, caule, flores e frutos. A produção, o rendimento e

os constituintes químicos podem ser interferidos por fatores ambientais, processo de extração, fisiologia e genética da planta (SIMÕES et al., 2007).

Na literatura existem poucos relatos a respeito da aplicação de óleos essenciais sobre biofilme formado por *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto estudos com novos vegetais são necessários uma vez que ambas apresentam grande resistência quando em biofilme, sendo assim são de difícil eliminação e causam problemas de ordem econômica e de saúde pública. Como a eliminação de biofilmes em superfícies é uma tarefa exigente e difícil, o procedimento de higienização deve ser analisado como um todo, otimizando os resultados e minimizando os custos.

Objetivou-se, com a realização deste estudo, identificar e quantificar os componentes químicos de óleos essenciais de folhas secas de *Curcuma longa* L. (Açafrão) e *Bixa orellana* L. (Urucum); determinar a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; avaliar o potencial de formação de biofilme das bactérias *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em superfície de polipropileno, quando cultivadas em TSB; avaliar o potencial bactericida dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. separadamente e combinados, no biofilme maduro; e, avaliar por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão aspectos morfológicos do biofilme maduro, bem como a ação dos óleos essenciais sobre células planctônicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilmes microbianos

As primeiras observações de biofilme datam de 1674, quando Antonie van Leuwenhoek, usando seu primitivo microscópio, notou a presença de agregados na superfície de dentes de humanos, denominados por ele de “animálculos” (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Zobell, em 1943, observou populações marinhas por microscopia direta e concluiu a preferência dessas bactérias em crescer sobre superfícies, formando populações sésseis. Em 1964, Ralph Mitchelland e Kevin Marshall, analisaram o primeiro estágio da formação do biofilme por bactérias de cultura pura e distinguiram entre a adsorção reversível da bactéria à superfície e subsequente irreversibilidade (COSTERTON, 1999; STOODLEY et al., 2002).

A palavra biofilme foi criada e descrita em 1978 e desde então novas técnicas eletrônicas e estudos laboratoriais têm permitido uma descrição mais detalhada da formação dos biofilmes microbianos (VU et al., 2009).

De acordo com Donlan e Costerton (2002 citados por HARDING et al., 2009), biofilme é definido como uma comunidade sésil de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica extracelular, que eles mesmos produzem, caracterizada por células aderidas irreversivelmente a um substrato ou interface e que exibem alteração fenotípica em relação ao crescimento e transcrição de genes. Segundo tais autores, o termo biofilme não é usado para descrever o crescimento de fungos filamentosos associado à superfície, mas pode ser substituído por biomassa fúngica, biomassa celular, emaranhado micelial ou fermentação no estado sólido ou submersa.

Para se considerar que células aderidas a uma superfície constituem um biofilme, Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) sugerem que seja necessário o

número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , enquanto Ronner e Wong (1993) e Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , respectivamente.

Quando em biofilme, células microbianas, apresentam propriedades benéficas a sua sobrevivência, por exibirem alterações fenotípicas com relação ao crescimento, expressão de genes e produção de proteínas, proteção a predadores e outros agentes externos, bem como acesso a fontes de nutrientes.

2.2 Composição do biofilme

Biofilmes são constituídos, principalmente, de água (95%) e matéria orgânica. De 50 a 98% do total da matéria orgânica seca são exopolissacarídeos (EPS) e, o restante, microrganismos (NOSYK et al., 2008).

Segundo Simões, Simões e Vieira (2009) biofilmes em laticínios são constituídos predominantemente de exopolissacarídeos, resíduos de leite, proteínas e fosfato de cálcio.

2.2.1 Exopolissacarídeos (EPS)

Os exopolissacarídeos são constituídos, principalmente, de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, fosfolipídios e ácidos teicóicos, obtidos da lise celular ou pela adsorção do ambiente (NOSYK et al., 2008; SHI; ZHU, 2009). A composição e quantidade dos mesmos variam de acordo com o tipo de microrganismo, idade do biofilme e diferentes condições ambientais, incluindo diferentes níveis de oxigênio e nitrogênio, variações de umidade, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes (VU et al., 2009).

Os polissacarídeos são essencialmente de cadeia molecular leve, muito longa, com massa molecular na ordem de $0,5-2,0 \times 10^6$ Da (SUTHERLAND,

2001). Em bactérias Gram-negativas, alguns dos polissacarídeos são neutros ou polianiônicos, sendo aumentada sua propriedade aniônica pela presença de ácido urônico, tais como D-glucurônico, D-galacturônico e ácidos mannurônico, ou piruvatos ligados a acetal, que permitem a associação de cátions divalentes, como cálcio e magnésio, aumentando a força de ligação em um biofilme desenvolvido. Em algumas bactérias Gram-positivas, a composição química dos EPS pode ser levemente diferente devido a sua natureza catiônica primária (VU et al., 2009).

Segundo Ma et al. (2009) no mínimo três exopolissacarídeos - alginato, Psl e Pel - contribuem para a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. O exopolissacarídeo Psl, codificado pelo locus de síntese de polissacarídeo, é composto de manose, galactose, ranmanose, glicose e traços de xilose, cuja função é a adesão da célula ao substrato e a manutenção da estrutura do biofilme.

O alginato, um polímero acetilado de alto peso molecular composto de monômeros não repetidos ligados por β 1,4 a ácidos L-galurônicos e D-mannurônico, é considerado o maior constituinte da matriz extracelular, sendo que a presença de ácido urônico acetilado no mesmo aumenta a capacidade de hidratação do biofilme. O Pel, polissacarídeo rico em glicose, é essencial para formação de uma película e estrutura do biofilme de *P. aeruginosa* linhagens PA14 e PAK (RYDER; BYRD; WOZNIAK, 2007).

Os exopolissacarídeos contribuem diretamente nas propriedades dos biofilmes, uma vez que permitem que quantidades apreciáveis de água se liguem a eles e na estabilidade mecânica, fazendo com que o mesmo resista à força do fluxo. Além disso, têm a função de proteção contra agentes externos, tais como bacteriófagos, bacteriocinas e sanificantes (SUTHERLAND, 2001).

2.2.2 Microrganismos

Em condições naturais biofilmes monoespécies são raros. Sendo assim, os biofilmes são compostos de misturas de microrganismos, podendo ser formados por bactérias, algas, protozoários, fungos filamentosos e leveduras. Estima-se que 99% dos microrganismos da Terra vivem no interior de EPS, podendo ser desenvolvidos em diferentes superfícies, tais como: solo e ambientes aquáticos, tecidos vivos, aparelhos médicos ou industriais, dentre outros (VU et al., 2009).

As bactérias apresentam maior capacidade de formação de biofilme, quando comparadas a outros organismos, devido ao seu reduzido tamanho, elevada taxa de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas celulares que as protegem do meio circundante. Dentre as bactérias que apresentam elevada capacidade de formar biofilme e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica destacam-se: *Pseudomonas* sp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, dentre outras.

Os fungos, por sua vez, são excelentes candidatos para formar biofilmes, visto que são adaptados para crescer em superfícies, como evidenciado pelo seu modo de absorção de nutrientes e secreção de enzimas extracelulares, para digerir complexas moléculas, e crescimento de hifas apical (HARDING et al., 2009). Alguns autores mencionam que biofilme por fungos filamentosos são comumente encontrados em ambientes expostos a altas umidades com maior interface de ar.

Gonçalves et al. (2006) observaram, através da técnica de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) e aparelho de oligonucleotídeo, que *Penicillium brevicompactum* é capaz de formar biofilme em superfícies de cupons de PVC-C e ferro fundido.

Villena et al. (2010) relataram que *Aspergillus niger* ATCC 10864 foi capaz de formar biofilme em tecidos de poliéster, apresentando estrutura bastante semelhante a biofilmes formados por outros microrganismos, ou seja, com canais bem estruturados que representam 13% da área total e hifas intumescidas ao longo deles.

Estudo desenvolvido por Seneviratne et al. (2009) revelou que *Candida albicans* e *Candida glabrata* foram capazes de iniciar o processo de adesão em 1,5 hora alcançando a maturidade em 48 horas, em substrato de poliestireno.

2.2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* descrito por Walter Emil Friedrich August Migula em 1894, pertence à família das Pseudomonadaceae e compreende várias espécies, identificadas por diferentes métodos, que incluem morfologia e estrutura celular, composição da parede celular, tipos de pigmentos, características metabólicas e nutricionais, produção de antibióticos, patogenicidade, estrutura antigênica e características ecológicas e genéticas (PEIX; RAMIREZ-BAHENA; VELAZQUEZ, 2009).

Pseudomonas são bactérias Gram-negativas, aeróbias, catalase positiva, não formadoras de endósporos, possuem a forma de bastonete reto ou ligeiramente curvo com dimensões de 0,5 - 1,0 μm de largura por 1,5 - 4 μm de comprimento; a motilidade dá-se por meio de inserção polar dos flagelos; têm requerimentos nutricionais simples e crescem quimiorganotroficamente, exceto algumas espécies que são quimiolitotróficas facultativas, as quais utilizam H_2 ou CO_2 como fonte de energia; crescem em pH neutro e a temperaturas na gama mesofílica (Figura 1). O metabolismo de *Pseudomonas* é tipicamente respiratório, sendo o oxigênio o aceptor final de elétrons. Em alguns casos, o nitrato pode ser usado como aceptor alternativo de elétrons, permitindo que,

nessas situações, o crescimento ocorra em condições de anaerobiose (PALLERONI; DOYDOROFF, 1972).

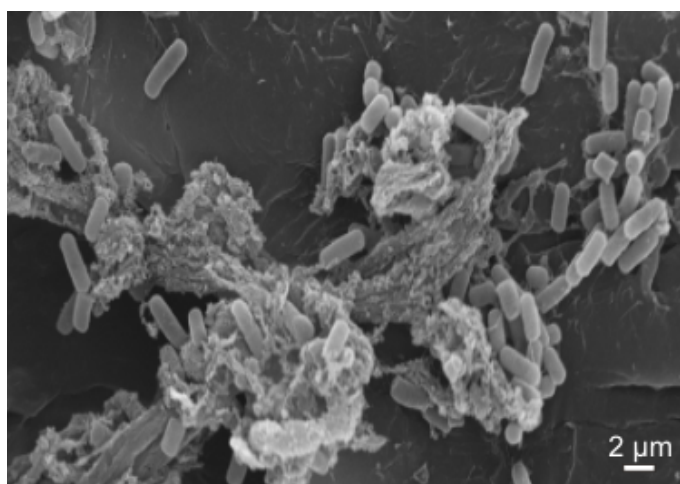


Figura 1 Eletromicrografia de varredura de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cultivada em TSB a 37 °C

Algumas linhagens do gênero *Pseudomonas* produzem pigmentos, sendo que alguns têm capacidade de difundir no meio, enquanto outros permanecem associados com a célula. Dentre os principais pigmentos produzidos destacam-se: pigmentos fluorescentes e verde-amarelado (*P. cepacia*, *P. marginata*, *P. caryophylli*); pigmentos fenazina, dos quais fazem parte os pigmentos verde-azulado (piocianina) de *P. aeruginosa*, pigmento verde (clororapina) de *P. chlororaphis* e o pigmento laranja (phenazina-I-ácido carboxílico) de *P. aureofacies*; pigmentos marrons (*P. marginata* e *P. solanacearum*); pigmento azul de *P. lemonnieri*, dentre outros (PALLERONI; DOYDOROFF, 1972).

Segundo Nouér (2005) o termo “*aeruginosa*” refere-se à característica da coloração azul esverdeada, formada pelas culturas devido à produção de

piocianina. *Pseudomonas aeruginosa* pode ser encontrada em uma grande variedade de habitats naturais e tem sido descrita como organismo oportunista capaz de causar infecções em humanos, plantas, insetos e animais.

No contexto de formação de biofilme, *Pseudomonas aeruginosa* tem sido o microrganismo modelo. Na literatura há vários relatos de biofilme em diferentes superfícies. Caixeta (2008) observou que *P. aeruginosa* formou biofilme em aço inoxidável, quando cultivada em leite desnatado reconstituído a 28 °C, no entanto na temperatura de 7 °C houve apenas adesão. Estudo realizado por Tebaldi (2008) resultou na formação de biofilme por *P. aeruginosa* em aço inoxidável a 37 °C.

2.2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes foi reconhecida pela primeira vez no ano de 1924 por Murray como a causadora de doenças entre cobaias de laboratório na Universidade de Cambridge. O nome proposto para o novo microrganismo foi *Bacterium monocytogenes*, mas somente em 1940 que Pirie modificou o gênero para *Listeria*, em homenagem ao cirurgião Lord Lister (HOF, 2003).

No gênero são reconhecidas seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*, sendo somente as espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* consideradas patogênicas em humanos e outros mamíferos, respectivamente (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

Os membros do gênero *Listeria* são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontrados no solo, na água, na vegetação, na ração animal, nas fezes de animais saudáveis e de humanos, em grande número de produtos alimentícios e em plantas de processamento de alimentos (MCLAUHLINA et al., 2004).

A contaminação por *L. monocytogenes* resulta em listeriose, considerada grande problema de saúde pública, devido à severidade da doença, que pode causar meningites, septicemia, aborto e morte em 20-30% dos casos; acomete principalmente mulheres grávidas, recém-nascidos e adultos com sistema imune debilitado (ALLERBERGER, 2003; PAPARELLA et al., 2008).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva na forma de bastonete com 1 - 2 μm de comprimento e 0,5 μm de largura, anaeróbica facultativa e não formadora de esporo (LOW; DONACHIE, 1997; SCHMID et al., 2005) (Figura 2). Sua ampla distribuição é favorecida pela capacidade de se desenvolver entre 0 e 45 °C, embora sua faixa ótima seja entre 30 e 37 °C, tolera extremos de pH 4,5-9, baixa atividade de água e concentrações de NaCl de 10% ou superiores e outras condições ambientais adversas (FILGUEIRAS; VANETTI, 2006; HAIN; STEINWEG; CHAKROBORTY, 2006). O crescimento à temperatura de 37 °C impede a produção de flagelo, sendo o mesmo sintetizado quando as células são crescidas à temperatura de 10-30 °C (GUERIRI et al., 2008).

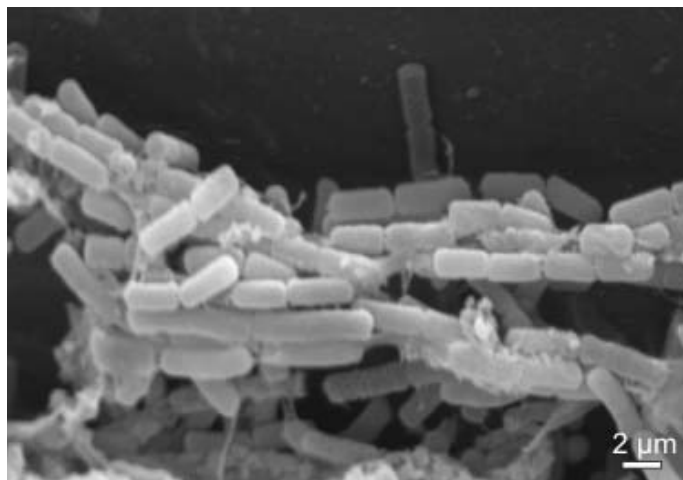


Figura 2 Eletromicrografia de varredura de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, cultivada em TSB a 37 °C

No contexto de posição filogenética, *Listeria* apresenta baixo conteúdo G-C no DNA que variam de 36 a 42% (ALLERBERGER, 2003).

Nas últimas décadas, *Listeria monocytogenes* tem sido considerada um grande problema na indústria de alimentos devido à habilidade de crescer em baixas temperaturas e sobreviver por extensos períodos sob condições adversas. Em parte, isso se deve à capacidade de formar biofilme em superfícies de processamento de alimentos e equipamentos que servem como reservatório e fonte primária de contaminação (GIANOTTI et al., 2008).

De acordo com Moretro e Langsrud (2004) a estrutura tridimensional do biofilme formado por *Listeria monocytogenes* já foi descrita, sendo o biofilme composto de células empilhadas umas sobre as outras ancoradas ao exopolissacarídeo. Entretanto, as células não parecem estar embebidas no material extracelular, como descrito para outros biofilmes bacterianos, mas conectadas ao material extracelular como um fio.

Chae e Schraft (2001) citam que *Listeria monocytogenes* pode aderir rapidamente e formar biofilme em superfícies tais como plástico, polipropileno, borracha, aço inoxidável e vidro, entretanto, a habilidade está condicionada ao tipo de linhagem. Oliveira et al. (2010) observaram somente a adesão de *L. monocytogenes* em cupons de aço inoxidável a 37 °C.

2.3 Relevância dos biofilmes

Os biofilmes desempenham um papel importante na natureza e em processos tecnológicos. O biofilme pode ser indesejável ou benéfico, dependendo da área de existência.

Na natureza, biofilmes microbianos apresentam um papel crucial na ciclagem de nutrientes aquáticos e terrestres, na biodegradação de poluentes ambientais, no processo de biorremediação, na recuperação de óleo, extração de metais, agricultura e no processo de nodulação de leguminosas (MENG-YING et al., 2009).

De acordo com Singh, Paul e Jain (2006) microrganismos que secretam polímeros e formam biofilme em superfícies de hidrocarbonetos são adequados para o tratamento de componentes de baixa degradabilidade e recalcitrantes, por causa da alta biomassa microbiana e habilidade de imobilizar componentes por biosorção, bioacumulação e biomineralização.

Os biofilmes por *Aspergillus niger* também têm sido aplicados na produção de enzimas e, recentemente, uma nova categoria de fermentação - fermentação por adesão à superfície - tem sido proposta (VILLENA et al., 2010)

Em contrapartida, eles podem ser indesejáveis na indústria em âmbito global. Na indústria de alimentos, a formação de biofilme conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas, devido a danos em alimentos e equipamentos. Duguid et al. (1966 citados por SHI; ZHU, 2009) relataram pela

primeira vez a adesão de *Salmonella*, em superfície de contato com alimento e, desde então, um grande número de relatos tem sido documentados, envolvendo *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dentre outras.

Pseudomonas, particularmente linhagens psicotróficas de *P. fluorescens*, estão envolvidas em deterioração de leite cru estocado em temperaturas de refrigeração e são capazes de formar biofilme em plantas de processamento, causando recontaminação do leite após a pasteurização (KIVES; ORGAZ; SAN JOSÉ, 2006).

Os microrganismos presentes no biofilme também catalisam reações químicas e biológicas causando corrosão em canos e tanques de metais, reduzem a transferência de calor, devido à espessura do biofilme, dentre outros (SHAHAFI; VAFAI, 2009).

Recentemente tem sido relatado que os biofilmes são responsáveis por 65% de todas as doenças humanas, incluindo otites, osteomelites, endocardites e fibrose cística. Nett e Andes (2006) citam que *Candida albicans* tem capacidade de formar biofilmes em implantes médicos, como cateteres urinários e vasculares, e causar impactos na área médica.

2.4 Formação da comunidade microbiana

Na literatura são relatados vários mecanismos pelos quais uma variedade de microrganismos são capazes de entrar contato com a superfície, aderir firmemente a ela, promover contato célula a célula e crescer como estruturas complexas (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). O entendimento do mecanismo envolvido na aderência inicial, desenvolvimento e maturação do biofilme, é importante para elucidar o impacto na medicina, indústria e áreas de saúde pública.

A formação do biofilme é governada, em parte, por fatores físico-químicos tais como hidrofobicidade, força de van der Waals, características ácido-básicas e propriedades elétricas (GIANOTTI et al., 2008), enquanto que o seu desenvolvimento depende da linhagem e das condições ambientais (pH, composição do meio de crescimento e temperatura, bem como das propriedades da superfície) (GUERIRI et al., 2008).

O processo de formação de biofilme é caracterizado, primeiramente, por uma etapa reversível na qual ocorre apenas a aderência da bactéria a superfície. Nessa etapa, células planctônicas são transportadas do meio líquido para uma superfície condicionada, composta de partículas orgânicas e inorgânicas, por meio de forças físicas (forças de van der Waals e forças de Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek - DVLO, interações estéricas e eletrostáticas) ou apêndice celular (flagelo e, ou, fimbria) (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Durante o primeiro estágio, moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no meio circundante são transportadas até a superfície por intermédio de difusão ou fluxo turbulento; o acúmulo dessas substâncias à superfície, denominado de filme condicionante, representa importante papel na aderência bacteriana, uma vez que pode alterar as propriedades físico-químicas da superfície (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007).

Na segunda etapa um grande número de células adsorvidas reversivelmente permanecem imobilizadas e tornam-se adsorvidas irreversivelmente. Pili ou fimbrias e flagelos propiciam o contato da célula à superfície estimulando reações químicas tais como oxidação e hidratação, vale ressaltar, que o processo de adesão pode ocorrer dentro de poucos minutos ou poucas horas. Na etapa seguinte ocorre a divisão celular aumentando rapidamente a população. Nesse estágio a presença de exopolissacarídeos e de cátions divalentes propiciam uma forte ligação entre as células, formando um biofilme maduro. Na etapa final ou de morte, ocorre a produção de enzimas, que

rompem partes do biofilme, que podem iniciar outro processo de adesão em um substrato fresco (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008) (Figura 3).

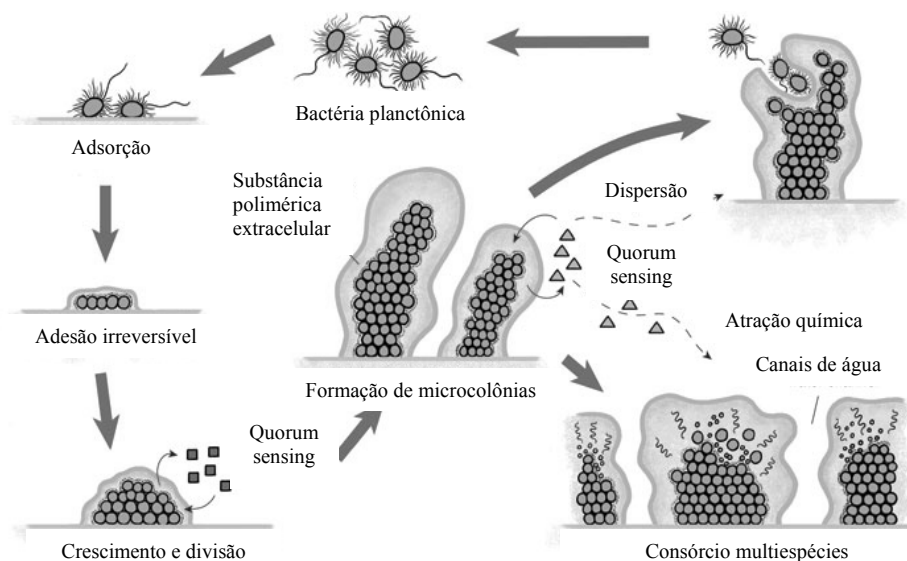


Figura 3 Formação do biofilme (HARRISON et al., 2005)

Uma extensão do modelo de formação de biofilme bacteriano tem sido proposta para fungos, que, por sua vez, difere pela presença de crescimento de hifas ou pseudohifas. Harding et al. (2009) propuseram um modelo preliminar para a formação de biofilme de fungos filamentosos, que compreende a adsorção de propágulos, ou seja, deposição de esporos ou fragmentos de hifas à superfície; aderência ativa à superfície, que, frequentemente, inclui a secreção de substâncias adesivas; formação primária de microcolônias, que consiste no alongamento apical e ramificação das hifas ao longo da superfície formando uma monocamada e produção inicial de exopolissacarídeo; formação secundária de microcolônias ou maturação inicial, que envolve a formação do micélio ou

adesão de hifa a hifa e formação de canais de água no interior do biofilme; maturação ou desenvolvimento reprodutivo, que é caracterizado pela formação de corpos de frutificação, escleródios e outras estruturas de sobrevivência; dispersão ou fase planctônica, que envolve a dispersão de esporos ou fragmentos do biofilme, que podem reiniciar o ciclo em outros substratos (HARDING et al., 2009).

Em resposta a várias condições ambientais o biofilme apresenta três estruturas diferentes: mosaico heterogêneo, modelo na forma de cogumelo e simples camada de microcolônias (RINAUDI et al., 2006).

O biofilme maduro é um ecossistema altamente organizado onde canais de água estão dispostos, o que permite uma efetiva troca de nutrientes e metabólitos que são removidos ou disponibilizados quando entram em contato com a água (SINGH; PAUL; JAIN, 2006). O oxigênio dissolvido é transportado através desses canais de água, dessa maneira, no interior do biofilme prevalecem microrganismos anaeróbios facultativos, enquanto que no topo e base são microrganismos aeróbios e anaeróbios, respectivamente (HOIBY et al., 2001).

O diâmetro dos canais de água pode variar de 50 a 100 μm , sendo que a velocidade do líquido pode ser de 0,002 a 0,015m/s (ZACARIAS et al., 2005). A espessura do biofilme é irregular e variável e pode apresentar desde uma camada de células fina a uma comunidade de células espessa embebida dentro de uma matriz polimérica de arquitetura sofisticada, onde as microcolônias podem existir como pilares discretos ou em forma de cogumelos (SHIRTLIFF; MADER; CAMPER, 2002). Hoiby et al. (2001) citam que a espessura é determinada por um equilíbrio entre o crescimento e desadesão da biomassa do biofilme.

Nett e Andes (2006) mencionam que *Candida albicans* é capaz de formar biofilme estruturado entre 24 – 48 horas, apresentando uma estrutura tridimensional com mais de 100 μm de profundidade.

2.4.1 Fatores que influenciam na formação do biofilme

A transição de células planctônicas para biofilme é regulada por uma variedade de condições ambientais e fisiológicas, tais como estresse celular, densidade de célula, disponibilidade de nutrientes, temperatura, dentre outras.

2.4.1.1 Propriedades físico-químicas das células

As propriedades físico-químicas da superfície celular são aspectos importantes no processo de adesão.

A superfície da maioria das células bacterianas é carregada negativamente, o que dificulta o processo de adesão devido a forças repulsivas eletrostáticas. As forças repulsivas podem ser reduzidas pela presença de fimbrias ou pili, flagelo e lipopolissacarídeo na superfície celular, tornando-a hidrofóbica (SHI; ZHU, 2009).

O exopolissacarídeo é responsável pelo desenvolvimento da estrutura do biofilme, enquanto que pili e flagelo são essenciais para iniciar a interação entre as células e o substrato (HORI; MATSUMOTO, 2010).

A matriz extracelular é caracterizada como fator primordial na formação do biofilme, constituída, na maioria das espécies, de polissacarídeo, proteínas e ácidos nucléicos, cujas funções são iniciar o processo de adesão, conservar os nutrientes no interior do biofilme, fornecer estrutura ao biofilme, proteger as células contra agentes antimicrobianos e desidratação (KUMAR; ANAND, 1998).

Pili são apêndices celulares altamente estruturados constituído de várias subunidades protéicas e uma simples, denominada pilina. São encontrados distintos tipos, denominados de pili tipo I, pili Pap, pili tipo IV e pili curli, que variam em relação à função, estrutura molecular, localização na superfície

celular e mecanismo de secreção (HORI; MATSUMOTO, 2010; MANDLIK et al., 2007).

O pili tipo IV, também denominado TFP ou fimbria tipo IV, termo criado em 1975 por Ottow, apresenta 5-7 nm de diâmetro e vários μm de comprimento e é composto primariamente por uma pequena subunidade protéica, denominada PilA ou pilina. O pili tipo IV é responsável pela motilidade *twitching* ou motilidade de contração, descrito por Lautrop em 1961 para relatar a motilidade na superfície, independente do flagelo em *Acinetobacter calcoaceticus* (MATTICK, 2002).

Em *P. aeruginosa*, mutantes incapazes de produzir motilidade de contração formam colônias lisas em placas de ágar, enquanto que células do tipo selvagem formam colônias planas difundidas com aspecto áspero e uma pequena zona de contração periférica constituída de uma fina camada de células (MATTICK, 2002). No contexto de formação de biofilme, *P. aeruginosa*, utiliza o pili tipo IV para mover-se na superfície e formar microcolônias (HORI; MATSUMOTO, 2010).

O pili tipo I ou TIF é comumente encontrado em Enterobacteriaceae e usualmente observado em *E. coli* patogênica. O TIF tem sido relatado como responsável pelo estabelecimento inicial do biofilme em *E. coli* K12 e importante fator de virulência (MOREIRA et al., 2003).

O flagelo é composto por filamento helicoidal de comprimento variável (5 a 10 μm), com diâmetro de 20 nm; uma pequena estrutura curvada conhecida por gancho e um corpo basal constituído de uma haste central e vários anéis. O flagelo é responsável pela motilidade de natação e *swarming*, que contribuem para o processo de adesão e formação de biofilme (HARSHEY, 2003).

A motilidade *swarming* foi descrita pela primeira vez por Hauser em 1885 e consiste em um processo pelo qual a bactéria pode, rapidamente,

locomover-se na superfície de maneira coordenada (VERSTRAETEN et al., 2008).

Johnson (2008) cita que genes envolvidos na motilidade flagelar e quimiotaxia influenciam na habilidade de alguns tipos de bactérias de formar biofilme, bem como na morfologia do mesmo.

Pesquisas atuais indicam que a expressão de genes de bactérias vivendo em biofilme ou outras comunidades diferem significativamente de células livres, fator que pode ser mediado por um processo denominado *quorum sensing* (JOHNSON, 2008). O *quorum sensing* enfatiza o fato de que um número suficiente de bactérias é necessário para induzir ou reprimir a expressão de genes alvos. As moléculas sinalizadoras, utilizadas pelo sistema *quorum sensing*, são freqüentemente a Homoserina lactona acilada para bactérias Gram-negativas, e pequenos peptídeos, para bactérias Gram-positivas, autoinducer-2 (AI-2) pode ser encontrado em ambas as bactérias (JUHAS; EBERL; TUMMLER, 2005). O sistema de comunicação de célula a célula dependente de homoserina lactona acilada e tem sido identificado em várias espécies, incluindo *P. aeruginosa*.

Shirliff, Mader e Camper (2002) citam que a habilidade de *quorum sensing* de *P. aeruginosa* é dependente de dois sistemas distintos: *las* e *rhl*. Davies et al. (1998) foram os primeiros pesquisadores a relatar o envolvimento do *quorum sensing* na regulação da formação do biofilme por *P. aeruginosa*, em que mutantes *las* somente formam biofilmes planos e indiferentes e, o tipo selvagem, forma microcolônias separadas por canais de água, ou seja, o sistema *las* é requerido para o desenvolvimento do biofilme estruturado.

2.4.1.2 Fontes de nutrientes

As condições nutricionais são de grande importância no desenvolvimento e estrutura do biofilme. Kawarai et al. (2009) investigaram a

capacidade de formação de biofilme por *Escherichia coli* K-12 em meio LB contendo NaCl e sacarose, contudo foi observado que a bactéria formou biofilme em LB suplementado com 1 M de sacarose, ocorrendo diminuição significativa em 1,5 M. A concentração de 1 M de NaCl foi suficiente para inibir por completo a formação do biofilme.

A fonte de carbono e micronutrientes pode influenciar diretamente no modelo de biofilme formado por *Pseudomonas aeruginosa*, que varia desde um biofilme plano a um biofilme altamente estruturado. Segundo Parsek e Tolker-Nielsen (2008) quando o citrato é utilizado como fonte de carbono, forma-se biofilme de superfície plana, que pode ser claramente diferenciado de biofilme crescido em glicose, contendo estrutura multicelular em formato de cogumelo separado por canais preenchidos com água.

2.4.1.3 Fatores ambientais

O pH do meio pode influenciar diretamente no crescimento bacteriano bem como na formação do biofilme. O pH ótimo para produção de polissacarídeo na maioria das bactérias gira entorno de 7, no entanto quando ocorrem variações bruscas no pH externo pode haver alterações no metabolismo causando um efeito biocida no microrganismo (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008). Estudo realizado por Rinaudi et al. (2006) mostraram que o pH ótimo para formação do biofilme de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 (bactéria fixadora de nitrogênio) a 28 °C foi 7, ocorrendo considerável diminuição em pH 6 e 8.

Listeria monocytogenes é capaz de crescer em baixo pH, no entanto Tresse et al. (2006) observaram que algumas linhagens apresentaram maior capacidade de adesão quando crescidas em pH 7. Diante disso, tais autores concluíram que a diminuição da adesão de *Listeria monocytogenes* em pH 5

pode estar atribuída à baixa regulação da síntese de flagelina em condições de acidez.

A temperatura está correlacionada com o índice de reações de enzimas e tem efeito direto no desenvolvimento das células, além de afetar as propriedades físicas no interior e ao seu redor (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Numerosas pesquisas têm demonstrado que *Listeria monocytogenes* tem habilidade de aderir em superfícies em temperaturas que variam de 4 a 45 °C. Mai e Conner (2007) realizaram estudo a fim de observar o efeito da temperatura no processo de aderência de *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável e notaram que houve maior aderência a 30 e 37 °C, do que 4, 20 e 42 °C, quando cultivada em BHI. Tais autores citam que *L. monocytogenes* produz exopolissacarídeo a 21 °C, mas não a 10 ou 35 °C e possui numerosos flagelos a 20 °C e poucos a 37 °C.

Di Bonaventura et al. (2008) investigaram a habilidade de 44 linhagens de *Listeria monocytogenes* de formar biofilme em três diferentes superfícies (poliestireno, vidro e aço inoxidável) a diferentes temperaturas (4, 12, 22 e 37 °C). A formação do biofilme nas três superfícies foi melhor na temperatura de 37 °C, sendo maior na superfície de vidro, seguida de aço inoxidável e poliestireno, enquanto que, na temperatura de 4 °C, houve significativa redução na formação do biofilme para as três superfícies analisadas.

Forças hidrodinâmicas são parâmetros chaves que podem influenciar na adesão inicial, formação e estrutura do biofilme, sendo que altas forças de cisalhamento, resultantes do atrito entre partículas ou fluxo de ar/líquido, geram biofilmes densos e fortes (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002; ROCHEX et al., 2008). No entanto, certas forças de cisalhamento no sistema de biofilme são necessárias para produzir uma estrutura estável e compacta (LIU; TAY, 2002).

Resultado de estudo realizado por Simões, Simões e Vieira (2008) indicou que condições hidrodinâmicas tiveram um notável impacto na estrutura do biofilme por diferentes linhagens de *Pseudomonas fluorescens*, em que o biofilme turbulento apresentou mais ativo, maior massa aderida à superfície, maior número de células cultiváveis e totais e maior quantidade de proteínas por grama de biofilme, quando comparado ao biofilme laminar.

2.5 Superfícies envolvidas na formação do biofilme

O biofilme pode ser formado em vários ambientes, desde que condições favoráveis como água, nutriente e superfície, sejam disponibilizadas para o microrganismo. A superfície é considerada um dos principais responsáveis pela existência do biofilme em ambientes naturais e sintéticos, podendo ser encontrado em superfícies de plantas, dentes, casco de navios, rios e lagos, cerâmica, dentre outros (SHAFABI; VAFAI, 2009).

Na indústria alimentícia, um número considerável de superfícies tais como aço inoxidável, vidro, polietileno de baixa densidade, ferro fundido, borracha, policarbonato e polipropileno, são alicerces para a adesão microbiana. No entanto, as características da superfície, como carga elétrica, capacidade de retenção de água, energia livre e topografia, representam importante papel no processo de adesão (PLOUX et al., 2007). Shi e Zhu (2009) mencionam que as células aderem melhor em superfícies hidrofílicas (aço inoxidável, vidro etc.), do que em superfícies hidrofóbicas (borracha e outros plásticos).

Dentre os vários tipos de materiais utilizados em equipamento de processamento de alimentos, o aço inoxidável AISI 304 (*American Iron and Steel Institute*) é o material mais utilizado, devido à estabilidade físico-química e alta resistência à corrosão (ORTEGA et al., 2010).

Atualmente o uso do polipropileno na indústria, para construção de tanques, acessórios, tubulações e superfícies de processamento de alimentos tem crescido rapidamente (LUGÃO et al., 2007). As principais características do polipropileno no tocante a sua alta aceitação e significativo crescimento são baixo custo; alta rigidez; baixo peso específico (especialmente quando orientado); boa claridade; excelente resistência química; e, alta temperatura de fusão (ponto de fusão de 170 °C). As desvantagens do polipropileno são, basicamente, a pouca resistência ao impacto em baixas temperaturas, a faixa reduzida da temperatura de fusão e a baixa resistência à oxidação (MONTENEGRO et al., 2010).

A produção industrial do polipropileno se inicia a partir da destilação do óleo cru (petróleo) de onde se produz a nafta que, em um processo físico-químico de craqueamento, origina compostos aromáticos (benzeno, tolueno e xilol) e oleofinas (etileno, butadieno e propileno); a polimerização do propileno (P) produz o polipropileno (PP) (KOLESKI; BALLESTERO, 2007). Lugão et al. (2007) referem-se ao polipropileno como um polímero linear com estrutura polimérica apolar.

Na literatura existem vários estudos referentes à adesão microbiana em superfície de aço inoxidável e polipropileno. Oulahal et al. (2008) testaram a capacidade de *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua* de aderir nas superfícies de polipropileno e aço inoxidável. Resultados mostraram que ambas as bactérias aderiram nas superfícies testadas em um período de 5 horas a 37 °C, sendo que *L. innocua* apresentou melhor aderência. *Escherichia coli* e *S. aureus* foram capazes de aderir em superfície de polipropileno em 8 horas, a 12 e 30 °C, contudo, a aderência de *E. coli* foi significativamente maior do que *S. aureus* em ambas as temperaturas (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

2.6 Mecanismos de resistência das comunidades microbianas

Grande diversidade de microrganismos é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, apresentando certas vantagens quando comparadas a células planctônicas, incluindo resistência a antimicrobianos.

Acredita-se que um biofilme pode ser de 10 a 1000 vezes mais resistente a agentes antimicrobianos, do que células em suspensão, podendo tal resistência ser explicada, por variações proteômicas e fenotípicas (CHAVANT; GAILLARD-MARTINIE; HEBRAUD, 2004). Segundo Ren et al. (2005) 40% das proteínas da parede celular de células em biofilme diferem das proteínas de células planctônicas, que, conseqüentemente, levam à não ligação dos antibióticos a alvos específicos.

Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos são: interferência na síntese da parede celular, ácidos nucleicos e proteínas, e intervenção nas rotas metabólicas. No entanto, a resistência varia de acordo com diferentes espécies microbianas e envolve vários mecanismos. Dentre os principais mecanismos destacam-se: aquisição de genes que codificam enzimas, que, conseqüentemente, destroem o agente antimicrobiano antes de atuar sobre a célula; aquisição da bomba de efluxo que causa a expulsão do agente antimicrobiano da célula antes de reagir com o alvo; aquisição de vários genes para a rota metabólica, que produz uma parede celular alterada, ou seja, não possui sítio de ligação para o antimicrobiano específico; e, aquisição de genes de outras espécies resistentes, processo esse denominado de evolução horizontal, sendo os principais mecanismos a conjugação, transdução e transformação (MARQUEZ, 2005; TENOVER, 2006).

Em um biofilme multiespécie ocorre uma série de eventos, como transferência de genes, aumento na tolerância a antimicrobianos, proteção a

mudanças no ambiente e ao sistema imune de um hospedeiro (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Simões, Simões e Vieira (2009) mencionam que um biofilme multiespécie apresenta maior estabilidade e resistência do que um biofilme simples. Estudo realizado por tais autores confirmaram que o biofilme formado *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* foi cinco vezes mais ativo metabolicamente do que o biofilme formado apenas por *P. fluorescens*, que, por sua vez, foi cinco vezes mais ativo metabolicamente que *B. cereus*, apresentando maior biomassa, densidade celular, produção de proteínas e exopolissacarídeos. Tais autores observaram também maior resistência do biofilme multiespécie quando exposto a soluções *Cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) e glutaraldeído (GLUT), com uma significativa proporção da população permanecendo no estado viável.

Estudo realizado por Harrison, Turner e Ceri (2005) mostraram que células próximas do fluido que circunda o biofilme têm maiores acesso a nutrientes e oxigênio, quando comparado as células no centro da matriz ou do substrato, como consequência as células na camada externa da comunidade crescem mais rapidamente do que as que estão no interior. Segundo tais autores, este é um dos principais mecanismos de defesa, pois muitos dos antimicrobianos são efetivos somente contra células de crescimento rápido e células no centro da comunidade são mais protegidas, uma vez que a matriz do biofilme é carregada negativamente.

Um dos mais intrigados mecanismos de defesa envolve sinalização intercelular. O *quorum sensing* é conhecido por afetar a produção de enzimas envolvidas na reparação celular e defesa. O mecanismo aumenta a produção de moléculas que expõem os componentes da célula, chamadas de bomba de efluxo de multidrogas (HARRISON; TURNER; CERI, 2005).

Existe também heterogeneidade entre os tipos celulares no biofilme que contribuem para a tolerância a antimicrobianos. Célula de sobrevivência especializada chamada de persistente é variante de baixo crescimento que existe em todas as populações bacterianas, programadas para sobreviver em ambientes de estresse, incluindo exposição a antimicrobianos.

2.7 Métodos para monitoramento do biofilme

O recente uso de técnicas moleculares, tais como hibridização *in situ* de fluorescência (FISH), microautoradiografia combinada com FISH (MAR-FISH), microsensores combinados com FISH e reação em cadeia de polimerase (PCR), dentre várias outras, combinadas com FISH, tem possibilitado o monitoramento das comunidades de biofilmes bacterianos. Este envolve a identificação de afiliações filogenéticas, a determinação de distribuição espacial, esclarecimento de funções e atividades e a coordenação estabelecida nos biofilmes (AOI, 2002).

Além do uso de técnicas moleculares, têm-se utilizado vários outros métodos para enumeração e amostragem do biofilme, como medidas de impedância, bioluminescência, microscopia, contagem padrão em placa e testes colorimétricos, cuja amostra é corada com cristal violeta ou safranina (SENEVIRATNE et al., 2009).

Técnicas microscópicas têm sido consideradas as melhores na visualização do processo de adesão, crescimento e formação do biofilme, podendo ser utilizados microscópios ópticos, eletrônicos, epifluorescência, contraste de fase, força atômica e outros (PARIZZI et al., 2004).

2.7.1 Microscopia eletrônica

A história da microscopia eletrônica iniciou-se com a descoberta da ótica eletrônica geométrica em 1926 por Busch e da ótica eletrônica de ondas por French. O microscópio eletrônico de transmissão foi descrito em 1931 por Max Knoll e Ernst Ruskar e somente em 1935 foi construído o primeiro microscópio eletrônico de varredura (BOGNER et al., 2007).

Antes do desenvolvimento da microscopia eletrônica, células bacterianas podiam ser observadas por microscopia de luz, no entanto não era possível a visualização das ultraestruturas bacterianas, devido ao limite de resolução de aproximadamente 200 nm (CURRY; APPLETON; DOWSETT, 2006).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) permite observar e caracterizar microestruturas internas de materiais com alta resolução, enquanto que a microscopia eletrônica de varredura (MEV) é aplicada para observar a superfície de amostras (HINKS, 2009).

A observação em MET em alta resolução, requer o uso de cortes ultrafinos, com dimensões menores de 100 nm, no entanto a maioria das bactérias apresenta medidas superiores a esta. Diante desse problema, técnicas convencionais de preparo de amostras de MET são usadas ao longo de muitos anos (ELTSOV; ZUBER, 2006).

O protocolo de preparo das amostras baseia-se na fixação química, que transforma o material biológico pela incorporação da substância química que conseqüentemente previne a degradação dos componentes celulares; a amostra fixada é desidratada, normalmente emprega-se o etanol, e embebida em resina que permite realizar cortes ultrafinos e ainda promove resistência em relação ao ambiente do MET; por fim, os cortes ultrafinos são embebidos em metais pesados para aumentar a dispersão dos elétrons, que aumenta o contraste (ELTSOV; ZUBER, 2006).

A principal desvantagem observada na aplicação da MET é no preparo da amostra, devido à dificuldade, custo e demanda de tempo, e, possivelmente, colapso de estruturas durante o preparo e observação.

A MET tem sido amplamente aplicada no estudo de algumas ultraestruturas bacterianas tais como flagelo, pili, esporos, parede celular, membrana citoplasmática e outros (CURRY; APPLETON; DOWSETT, 2006).

A microscopia eletrônica é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme. A fixação das amostras é realizada utilizando-se agentes químicos, como glutaraldeído, paraformaldeído e ósmio, ou criofixadas em que a amostra é rapidamente congelada para evitar danos às células pelos cristais de gelo (COSTA, 1999).

O microscópio eletrônico de varredura consiste em excelente sonda de elétrons com energia de 40 keV, que é focada sobre o espécime, do qual faz uma varredura em linhas paralelas (BOGNER et al., 2007). Dessa maneira, a principal aplicação do MEV baseia-se na análise da topografia de superfícies.

As principais vantagens no uso da MEV incluem a fácil preparação da amostra, ampla variedade de magnitude, alta profundidade do campo e fácil interpretação das micrografias que são geradas e a diversidade do tipo de informação, além de ser uma técnica que combina com aspectos da microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. As desvantagens baseiam-se predominantemente na dificuldade de examinar espécimes isolados e a impossibilidade de examinar amostras hidratadas (JAMES, 2009).

A microscopia eletrônica de transmissão tem sido considerada poderosa ferramenta para análise da estrutura do biofilme. Por outro lado, métodos de microscopia que permitem um exame não invasivo de biofilmes vivos e no seu estado hidratado também são utilizados.

Gazzola e Cocconcelli (2008) observaram a formação de biofilme por *Staphylococcus epidermitis* através de MEV, quando exposto a vancomicina, e

concluíram que a bactéria apresentava resistência ao antibiótico. Utilizando-se da técnica de MET, esses autores observaram ainda o efeito da vancomicina na estrutura celular e que as bactérias apresentaram parede celular fina e aumento na espessura de acordo com a concentração de vancomicina no substrato.

Embora as técnicas microscópicas sejam as mais utilizadas nos estudos da estrutura do biofilme, existem alguns problemas na interpretação das imagens devido à presença de artefatos gerados durante o preparo da amostra. Dessa maneira, métodos tradicionais combinados com técnicas microscópicas revelam a complexa estrutura do biofilme, permitindo, assim, um melhor entendimento do ciclo de desenvolvimento do mesmo.

2.8 Controle do biofilme

Nas últimas décadas vários métodos de prevenção e eliminação do biofilme têm sido descritos na literatura. A erradicação normalmente requer o uso de sanificantes ácidos, alcalinos e/ou iodóforos. Contudo, algumas questões têm sido levantadas sobre a segurança de químicos sintéticos, especialmente aqueles aplicados à indústria de alimentos, e, diante disso, a aplicação de produtos naturais, como óleos essenciais, tem ganhado considerável atenção (KNOWLES et al., 2005).

2.8.1 Óleos essenciais

Desde os primórdios da humanidade, o homem depende das plantas para a sua existência, utilizando-as como alimento, medicamento, construção de abrigo, no aquecimento, dentre outras aplicações. As primeiras referências históricas importantes sobre a utilização dos óleos essenciais provêm do Oriente,

especialmente do Egito, onde eram usados em rituais religiosos e até mesmo para embalsamar múmias.

Segundo a Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação à pressão reduzida ou outro método adequado) (BRASIL, 2007).

Dependendo da família podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Podem ser estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, sendo poucos os óleos que apresentam coloração; em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, cujas propriedades são usadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES et al., 2007).

2.8.2 Biossíntese dos óleos essenciais

Métodos modernos apoiados em aparelhos cada vez mais sofisticados têm permitido um melhor conhecimento da composição química das plantas e da estrutura dos seus componentes ativos.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais estão distribuídos em duas classes químicas distintas: terpenóides e fenilpropanóides, sendo os terpenóides produzidos com maior abundância e mais frequência, enquanto que os fenilpropanóides são indispensáveis para características flavorizantes e odorizantes (SANGWAN et al., 2001). Outros compostos também fazem parte como alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres,

óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (Figura 4, com modificações) (SIMÕES et al., 2007).

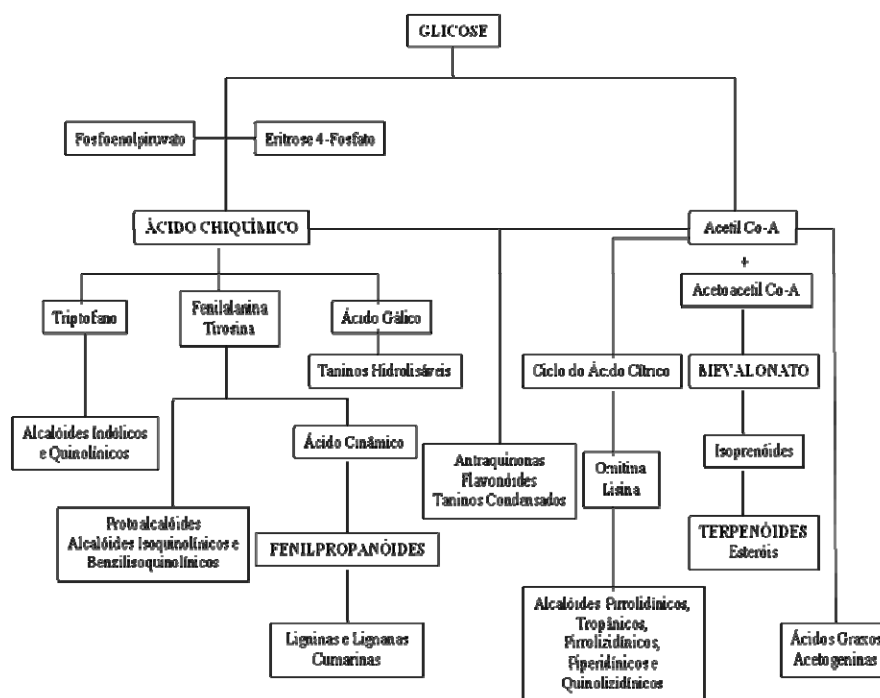


Figura 4 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários de vegetais (SIMÕES et al., 2007) com modificações

A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada frequentemente por fatores mecânicos, ambientais, fisiológicos e nutricionais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Entretanto, a forma de extração pode influenciar diretamente na obtenção dos constituintes químicos, sendo os principais métodos utilizados: hidrodestilação, prensagem, floração, microextração de fase sólida, extração de

fluido supercrítico, extração com solvente e extração com arraste a vapor d'água (DAWIDOWICZ et al., 2008).

A técnica de destilação foi o primeiro método de extração de óleos essenciais usado no Oriente (Egito, Índia e Pérsia) há mais de 2000 anos e foi aperfeiçoada no século IX pelos árabes (BURT, 2004). Contudo, visando reduzir tempo, custo, bem como melhorar a qualidade dos extratos, novos métodos estão sendo utilizados.

Estudo realizado por Dawidowicz et al. (2008) revelou que diferentes métodos de extração interferiram na composição química de *Thymus vulgaris* L., na qual a maior produção dos componentes timol e carvacrol deu-se por meio da destilação a vapor, com 77,8 e 3,3%, respectivamente, enquanto que a menor quantidade foi obtida por microextração de fase sólida com 48,5 e 1,7%, respectivamente.

2.8.3 Aplicações dos óleos essenciais

Estima-se que são conhecidos óleos essenciais de aproximadamente 3000 plantas, mas são comercializados em torno de 300, destinados às indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e agricultura (NEDOROSTOVA et al., 2009).

O mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$ 1,8 bilhão, sendo que a participação do Brasil é de apenas 0,1%, deste 80% refere-se ao comércio de óleo essencial de laranja, cujos principais consumidores estão incluídos nos setores de higiene pessoal, perfumaria e cosmética (COSTA, 2008).

Óleos essenciais ou seus componentes são utilizados como produtos de perfumaria, higiene pessoal, na agricultura, como preservantes e aditivos em alimentos, como remédios naturais, dentre várias outras aplicações, com um

mercado apresentando crescimento acima de 11% ao ano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Por serem considerados seguros (GRAS), a aplicação em alimentos tem sido adotada para melhorar o *flavour*, aroma, sabor e, ainda, por sua capacidade antimicrobiana. No ano de 1992, o timol foi avaliado pelo Comitê de Especialistas em Substâncias Aromatizantes do Conselho Europeu e, desde então, sua adição em alimentos foi permitida em um nível de até 50 mg/kg e, para bebidas, 10 mg/kg. No Brasil ainda não há referência na legislação quanto ao uso dessa substância em alimentos (JAKIEMIU, 2008).

2.8.3.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Na natureza os óleos essenciais representam um importante papel na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros; podem ainda atrair alguns insetos favorecendo a dispersão de pólen e sementes e repelir outros que são indesejáveis (BAKKLI et al., 2008).

A atividade biológica dos óleos essenciais depende da composição química, que é determinada por fatores genéticos e influenciada por condições ambientais e agronômicas (ROTA et al., 2008), bem como, por características do microrganismo (GARDINI et al., 2009).

Segundo Moreira et al. (2005), compostos fenólicos dos óleos, ligam a bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e extravasando os constituintes intracelulares ou danificando o sistema enzimático da célula. Souza et al. (2010) citam que mesmo pequenas mudanças ocorridas na estrutura da membrana citoplasmática podem afetar o metabolismo, incluindo a síntese de macromoléculas.

Estudos relacionados à atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tiveram início na década de 40 e, desde então, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas a respeito do assunto.

Nedorostova et al. (2009) testaram os óleos essenciais de 27 espécies de plantas sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Destes, apenas 13 foram ativos sendo que apenas os óleos essenciais de *Allium sativum* e *Armoracia rusticana* foram capazes de inibir todas as bactérias. *Staphylococcus aureus* foi inibida por todos os óleos ativos, seguida de *E. coli* (8), *L. monocytogenes* (7), *S. Enteritidis* (6) e *P. aeruginosa* (2).

Alguns estudos demonstraram que óleos essenciais de orégano, tomilho e alecrim estão entre os mais ativos antimicrobianos (DIMITRIJEVIC et al., 2007). Em estudo realizado por Rota et al. (2008) os resultados sugeriram que óleos essenciais de *Thymus hyemalis* (timol), *T. hyemalis* (carvacrol), *T. zygis* (timol) e *T. vulgaris* possuem propriedades antimicrobianas e são considerados fontes potenciais de ingredientes para a indústria de alimentos, uma vez que todos apresentaram uma forte inibição (zona de inibição > 20 mm), em relação a 9 das 10 linhagens bacterianas analisadas.

Várias outras plantas têm sido testadas para avaliar seus potenciais biológicos, terapêuticos e na atividade farmacêutica. Além disso, dietas ricas em antioxidantes naturais tais como fenóis, flavonóides e vitamina C são consideradas importantes na redução de doenças cardiovasculares, doenças crônicas e alguns tipos de câncer (HUSSAIN et al., 2008).

2.8.4 Descrição botânica de vegetais produtores de óleos essenciais

Óleos essenciais podem ser extraídos de uma grande diversidade de vegetais, tais como coentro, tomilho, capim-cidreira, orégano, lavanda, eucalipto, açafrão, urucum e outros de importância econômica.

2.8.4.1 *Curcuma longa* L. (Açafrão da Índia)

O açafrão da Índia (*Curcuma longa* L.), conhecido no mercado internacional como “*turmeric*”, pertence à família Zingiberaceae, subordem Zingiberoidae. No Brasil, pode ser conhecido, ainda, por açafroeira, açafrão-da-terra, batatinha amarela, gengibre dourada, mangarataia e cúrcuma, mas, por vezes, pode ser confundido com o açafrão verdadeiro (*Crucis sativus* L.), planta de clima mediterrâneo, não cultivada no país (CECÍLIO FILHO et al., 2000; MATA et al., 2004).

É uma planta originária do sudoeste da Ásia, mais precisamente das encostas de morros das florestas tropicais da Índia, e está distribuída em regiões tropicais e subtropicais por todo o mundo. No Brasil, o maior polo produtor de açafrão é a região de Mara Rosa (GO), pertencente à microrregião de Porangatu situada no norte de Goiás, cujo volume anual da produção varia de 500 a mil toneladas secas; essa produção equivale a 2000 a 5000 ton/ano de rizomas *in natura* (PLANO..., 2007).

De cultivo fácil, apresenta a vantagem de não exigir tratamentos culturais especiais podendo desenvolver-se em condições tropicais, em altitudes que variam do nível do mar a 1500 m e temperaturas de 20 a 30 °C, sob regime pluvial de aproximadamente 150 cm por ano ou sob irrigação, preferencialmente sob solo argiloso ou aluvial, fértil e rico em matéria orgânica. A planta apresenta folhas grandes de coloração verde, oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas que

exalam um odor agradável quando contusas; em condições de clima e solo favoráveis a parte aérea da planta atinge, em média, 120 a 150 cm de altura. Possui pecíolos tão compridos quanto os limbos que, reunidos em sua base, formam o pseudocaule; o rizoma principal ou central é piriforme, arredondado ou ovóide, com ramificações secundárias laterais, compridas e tuberizadas (CECÍLIO FILHO et al., 2000; NAGHETINI, 2006) (Figura 5).



Figura 5 Aspecto geral das partes aéreas (A) e rizomas (B) de açafrão

O açafrão é constituído principalmente de proteínas (6,3%), lipídios (5,1%), minerais (3,5%), carboidratos (69,4%), água (13,1%) e óleos essenciais (5,8%) (CHATTOPADHYAY et al., 2004). Segundo Chatterjee, Variyar e Gholap (2000), os principais compostos identificados nos óleos de cúrcuma e relatados na literatura incluem α -felandreno, 1,8-cineol, zingibereno, ar-curcumeno, turmerona, ar-turmerona, β -sesquifelandreno, curlona e dehidrozingerona

Os rizomas maduros, por conterem amido, óleo essencial e pigmentos corantes, têm sido muito utilizados na indústria alimentícia, como corante, aromatizante e ingrediente no preparo de temperos, além de possuir múltiplas atividades farmacológicas, incluindo antioxidação, antimicrobiana,

antiaterosclerótica, antiinflamatória, antidepressiva, uso na técnica analítica de boro e arsênio e nos métodos de colorimetria e espectrofotometria (MAIA; FERREIRA; ABREU, 2004; QIN et al., 2007).

O rizoma apresenta uma coloração amarelo-alaranjada devido à presença dos pigmentos curcumina e, em menor quantidade, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (UKPABI et al., 2008) (Figura 6).

A curcumina, considerada o principal pigmento responsável pela coloração do açafrão, foi isolada em 1815, mas, somente em 1973, Roughley e Whiting, determinaram sua estrutura química (CHATTOPADHYAY et al., 2004). O método oficial para analisar curcumina é baseado na medida de absorção por espectrofotometria direta com absorção entre 420 a 430 nm utilizando-se solventes orgânicos, contudo esse método é ineficaz na separação dos demais curcuminóides, sendo necessário, para tal finalidade, o uso de cromatografia de camada fina (TLC) ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) (JAYAPRAKASKA; MOHAN-RAO; SAKARIAH, 2005).



Figura 6 Cortes de rizoma de *Curcuma longa* L.

A principal aplicação do açafrão é condimentar, no entanto o mesmo apresenta ação antimicrobiana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, anticoagulante, tratamento de distorções biliares, anorexia, coriza, hepatite, sinusite, dentre outras (CHATTOPADHYAY et al., 2004).

Péret-Almeida et al. (2008) relataram que não foi observada atividade inibitória do óleo essencial para *Staphylococcus aureus* e para *Candida albicans*. Em contrapartida, inibiu o desenvolvimento de *Bacillus subtilis*, *S. choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que a maior atividade foi observada contra o *B. subtilis*, seguida do *S. choleraesuis* nas duas concentrações empregadas.

Em estudo realizado por Maia, Ferreira e Abreu (2004) os resultados evidenciaram que, após 21 dias, houve redução do número de *Escherichia coli* de aproximadamente dois ciclos logarítmicos e para *Enterobacter aerogenes* redução de aproximadamente um ciclo logarítmico, de 10^5 UFC/mL para 10^4 UFC/mL, nos tratamentos utilizados de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% de cúrcuma.

Dentre as várias espécies estudadas em âmbito mundial, tem-se a cúrcuma com grande potencial de emprego em vários segmentos da economia.

2.8.4.2 *Bixa orellana* L. (Urucum)

A espécie *Bixa orellana* L. pertence à família das Bixaceae sendo popularmente conhecida como urucu ou urucum, açafroa, açafroeira-da-terra, roucou, bija, achiote e annatto, conforme a região. *Bixa orellana* Linné foi assim denominada como uma forma de homenagem ao primeiro botânico e explorador que a estudou - Francisco de Orellana. O nome popular urucum provém do vocábulo tupi *uru-ku*, que significa amarelo (COSTA, 2007).

Originária de florestas tropicais da América do Sul, América Central e Ásia trata-se de um arbusto grande ou árvore pequena que pode atingir de 3 a 6

m de altura, dependendo das condições ecológicas e de sua idade; as folhas são simples, glabras, medindo de 8 a 11 cm de comprimento; as flores apresentam coloração levemente rosa, dispostas em panículas; os frutos são ovóides, tipo cápsula, dependendo da variedade, e apresentam um denso revestimento de espinhos moles e inofensivos de até 0,5 cm de comprimento. As cápsulas são chamadas de “cachopas”, variando de 360 a 4.900 por planta, comportam em seu interior uma média de 54 sementes, envoltas por arilos vermelhos que lhes dão a cor característica. Esta planta cresce em altitudes de até 1000 m, contudo desenvolve-se melhor em zonas relativamente baixas, de 100 a 500 m, suportando temperaturas de 24 a 35 °C (COELHO et al., 2003; OLIVEIRA, 2005; ROHDE; SILVEIRA; VARGAS, 2006) (Figura 7).



Figura 7 Folha fresca de Urucum

No Brasil, o urucum é cultivado por muitos anos sendo encontrado nos estados do Acre, Amazonas, Pará e também nos estados da Bahia, Ceará,

Paraíba e Piauí. Atualmente, outros estados como Rio de Janeiro e São Paulo têm se dedicado ao cultivo deste vegetal (OLIVEIRA, 2005). Excluídas as demandas internas, o comércio internacional médio anual de urucum é estimado em cerca de 10 mil toneladas, sendo dois terços desta produção na forma de semente bruta e o restante como extrato. A América Latina produz 60 % de todo o urucum consumido no mundo, seguida pela África com 27% e a Ásia 12% (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003).

As sementes de urucum são valiosas pela característica de produzir pigmentos - a orelhena, de cor amarela, e solúvel em água e a bixina, de cor vermelha, e solúvel em óleo - que são utilizados como corantes naturais nas indústrias alimentícias, farmacêutica e cosmética, correspondendo em torno de 90% do total de consumo de corantes naturais no Brasil e em torno de 70% dos corantes naturais mundialmente empregados em alimentos. As sementes do urucum contêm ainda celulose (40 - 45%), açúcares (3,5 - 5,2%), óleo essencial (0,3% - 0,9%), óleo fixo (3%), pigmentos (4,5 - 5,5%), proteínas (13 - 16%), alfa e beta-carotenos e outros constituintes (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008; SANTANA et al., 2008).

A coloração vermelha da semente está diretamente relacionada à bixina, pigmento presente em maior concentração, que compreende mais de 80% dos carotenóides totais, é lipossolúvel e, portanto, apresenta elevada ação antioxidante, em que suas duplas ligações conjugadas atuam como um excelente capturador de radicais livres (SANTANA et al., 2008).

Costa (2007) cita que os constituintes químicos de *B. orellana* são muitos, podendo-se mencionar alguns grupos de substâncias, como flavonóides, destacando-se o glicosídeo de apigenina, bisulfato de apigenina e hipoaletina; há também ácido gálico, ácido alfitólico, diterpenos (geraniol, geranil), além de vestígios de alcalóides; além destes, ainda há orelina, mono e sesquiterpenos, dentre outros carotenóides minoritários.

Segundo Lima et al. (2006) as sementes *Bixa orellana* L. são largamente empregadas na medicina popular como expectorante, na forma de xarope; em decocto, são usadas para gargarejos, como laxativas, estomáticas, anti-hemorragicas, cicatrizantes e contra dispepsia, enquanto que as sementes secas, em maceração ou decocção, também são usadas nos males de fígado, tuberculose, afecções do coração, problemas na pele, antipirético e anti-inflamatório, dentre outros.

Fleischer et al. (2003) relataram que as sementes e folhas também possuem ação antimicrobiana. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de folhas e sementes de *B. orellana* apresentou atividade antimicrobiana em relação a todas as bactérias testadas e sobre *Candida albicans*, sendo que a maior atividade deu-se com o extrato das folhas secas, com maior halo de inibição contra *E. coli* e *C. albicans* (22,5 mm) e as menores inibições em relação a *P. aeruginosa* (19 mm) e *Salmonella typhi* (17 mm).

Testando o efeito de vários óleos essenciais, sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua*, Salgado et al. (2003) observaram que, dentre as espécies analisadas, *Bixa orellana* L. apresentou ótimo índice de mortalidade em tal nematóide, aproximadamente de 91,9 %, sendo menos eficiente somente em relação à *Eucalyptus saligma* e *Melia azedarach*, com redução de 100% e 94,3%, respectivamente.

REFERÊNCIAS

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic, differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 183-189, Apr. 2003.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 833-838, July 1998.

ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M.; RODRIGUES, E. Comportamento higroscópico do extrato seco de urucum (*Bixa orellana* L). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1888-1892, nov./dez. 2008.

AOI, Y. *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 94, n. 6, p. 552-556, Dec. 2002.

BAKKLI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

BOGNER, A. et al. A history of scanning electron microscopy developments: towards “wet - stem” imaging. **Micron**, New York, v. 38, n. 4, p. 390-401, July 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº. 2**, de 15 de janeiro de 2007. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 set. 2008.

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.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilme formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CECÍLIO FILHO, A. B. et al. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 171-175, jan./fev. 2000.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 103-112, Feb. 2001.

CHATTERJEE, S.; VARIYAR, P. S.; GHOLAP, A. S. Effect of γ -irradiation on the volatile oil constituents of turmeric (*Curcuma longa*). **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 2, p. 103-106, Mar. 2000.

CHATTOPADHYAY, I. et al. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. **Current Science**, Columbus, v. 87, n. 1, p. 44-53, July 2004.

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; HEBRAUD, M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, n. 2, p. 241-248, Jan. 2004.

COELHO, A. M. S. P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, jan./dez. 2003.

COSTA, A. G. **Desenvolvimento vegetativo, rendimento e composição do óleo essencial de Patchouli após a adubação nitrogenada**. 2008. 92 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COSTA, C. K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana* L., Bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética**. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. 1999. 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1999.

COSTERTON, J. W. Introduction to biofilm. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bethesda, v. 11, n. 3/4, p. 217-221, May 1999.

CURRY, A.; APPLETON, H.; DOWSETT, B. Application of transmission electron microscopy to the clinical study of viral and bacterial infections: present and future. **Micron**, New York, v. 37, n. 2, p. 91-106, Nov. 2006.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, New York, v. 280, n. 5361, p. 295-298, Apr. 1998.

DAWIDOWICZ, A. L. et al. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, London, v. 76, n. 4, p. 878-884, Aug. 2008.

DI BONAVENTURA, G. et al. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1552-1561, June 2008.

DIMITRIJEVIC, S. I. et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 2, p. 774-782, Feb. 2007.

ELTSOV, M.; ZUBER, B. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. **Journal of Structural Biology**, New York, v. 156, n. 2, p. 246-254, Nov. 2006.

FILGUEIRAS, C. T.; VANETTI, M. C. D. Effect of eugenol on growth and Listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 3, p. 405-409, May 2006.

FLEISCHER, T. C. et al. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, n. 1/2, p. 136-138, Feb. 2003.

GARDINI, F. et al. Composition of four essential oils obtained from plants from Cameroon, and their bactericidal and bacteriostatic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, Pretoria, v. 3, n. 5, p. 264-271, May 2009.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, Bethesda, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, Sept. 2008.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 5, p. 851-875, Sept. 2005.

GAZZOLA, S.; COCCONCELLI, P. S. Vancomycin heteroresistance and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from food. **Microbiology**, New York, v. 154, n. 10, p. 3224-3231, Oct. 2008.

GIANOTTI, A. et al. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 1/2, p. 9-17, Mar. 2008.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n. 12, p. 513-516, Dec. 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GONÇALVES, A. B. et al. Fish and Calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 23, n. 3, p. 194-198, 2006.

GUERIRI, I. et al. The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. **Microbiology**, New York, v. 154, n. 8, p. 2251-2264, Aug. 2008.

HAIN, T.; STEINWEG, C.; CHAKROBORTY, T. Comparative and function algenomics of *Listeria* spp. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 37-51, Oct. 2006.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Developmental regulation of microbial biofilms. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 3, p. 228-233, June 2002.

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 475-480, Nov. 2009.

HARRISON, J. J. et al. Biofilms: a new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. **American Scientist**, New Haven, v. 93, n. 6, p. 508-510, Nov./Dec. 2005.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J.; CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Ottawa, v. 7, n. 7, p. 981-994, July 2005.

HARSHEY, R. H. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 249-273, Oct. 2003.

HINKS, J. A. A review of transmission electron microscopes with in situ ion irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, Amsterdam, v. 267, n. 23/24, p. 3652-3662, Dec. 2009.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 199-202, Apr. 2003.

HOIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan. 2001.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: from mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 424-434, Feb. 2010.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 986-995, June 2008.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAMES, B. Advances in “wet” electron microscopy techniques and their application to the study of food structure. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 3/4, p. 114-124, Apr. 2009.

JAYAPRAKASHA, G. K.; MOHAN-RAO, L. J.; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 16, n. 12, p. 533-548, Dec. 2005.

JOHNSON, L. R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 251, n. 1, p. 24-34, Mar. 2008.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TUMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, Netherlands, v. 7, n. 4, p. 459-471, Apr. 2005.

KAWARAI, T. et al. Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 107, n. 6, p. 630-635, Dec. 2009.

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

KNOWLES, J. R. et al. 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.

KOLESKI, S. D.; BALLESTERO, S. D. Redução do impacto ambiental pela reciclagem de resíduos de polipropileno expandido na produção de autopeças. **Revista Biociência**, Taubaté, v. 13, n. 3/4, p. 167-177, jul./dez. 2007.

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

LIMA, R. J. C. et al. Taninos hidrolisáveis em *Bixa orellana* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 507-509, maio/jun. 2006.

LIU, Y.; TAY, J. H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. **Water Research**, New York, v. 36, n. 7, p. 1653-1665, Apr. 2002.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 153, n. 1, p. 9-29, Jan. 1997.

LUGÃO, A. B. et al. Review on the production process and uses of controlled rheology polypropylene-gamma radiation versus electron beam processing. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 76, n. 12, p. 1688-1690, Dec. 2007.

MA, L. et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. 1-11, Mar. 2009.

MAI, T. L.; CONNER, D. E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 282-286, Dec. 2007.

MAIA, S. R.; FERREIRA, A. C.; ABREU, L. R. Uso do açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 358-365, mar./abr. 2004.

MANDLIK, A. et al. Pili in gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 33-40, Jan. 2007.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, Paris, v. 87, n. 12, p. 1137-1147, Dec. 2005.

MATA, A. R. et al. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 151-157, jan./mar. 2004.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 289-314, Nov. 2002.

MCLAUHLINA, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 15-33, Apr. 2004.

MENG-YING, L. et al. Evaluation of biological characteristic of bacteria contributing to biofilm formation. **Pedosphere**, Bethesda, v. 19, n. 5, p. 554-561, Sept. 2009.

MONTENEGRO, R. S. P. et al. **Polipropileno**. Disponível em: <<http://www.bndes.gov.br>>. Acesso em: 23 mar. 2010.

MOREIRA, C. G. et al. Role of type I fimbriae in the aggregative adhesion pattern of enteroaggregative *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 79-85, Sept. 2003.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 5, p. 565-570, Aug. 2005.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 107-121, Sept. 2004.

NAGHETINI, C. C. **Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 157-160, Feb. 2009.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 340-345, Aug. 2006.

NOSYK, O. et al. A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 449-456, Dec. 2008.

NOUÉR, S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente**. 2005. 144 f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2005. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

ORTEGA, M. P. et al. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 573-578, Apr. 2010.

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 178-185, Feb. 2008.

PALLERONI, N. J.; DOYDOROFF, M. Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. **Annual Reviews Physiopathology**, Cambridge, v. 10, p. 73-100, 1972.

PALMER, J.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v. 34, n. 9, p. 577-588, Sept. 2007.

PAPARELLA, A. et al. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, Dec. 2008.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 77-83, Mar. 2004.

PARSEK, M. R.; TOLKER-NIELSEN, T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 560-566, Dec. 2008.

PEIX, A.; RAMIREZ-BAHENA, M. H.; VELAZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 6, p. 1132-1147, Dec. 2009.

PÉRET-ALMEIDA, L. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 875-881, maio/jun. 2008.

PLANO de desenvolvimento APL do açafão de mara rosa e região. Goiânia: SGC, 2007. Disponível em: <<http://www.sgc.goias.gov.br>>. Acesso em: 3 jan. 2008.

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

POMPERMAYER, D. M.; GAYLARDE, C. C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 4, p. 361-365, Aug. 2000.

QIN, N. Y. et al. Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 486-492, Jan. 2007.

REN, D. et al. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4022-4034, July 2005.

RINAUDI, L. et al. Effects of nutritional and environmental conditions on *Sinorhizobium meliloti* biofilm formation. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 9, p. 867-875, Nov. 2006.

ROCHEX, A. et al. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. **Water Research**, New York, v. 42, n. 20, p. 4915-4922, Dec. 2008.

ROHDE, D. C.; SILVEIRA, S. O.; VARGAS, R. R. A. O uso do corante urucum (*Bixa orellana* L.) na técnica de coloração histológica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 119-121, abr. 2006.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Thyphimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 9, p. 750-758, Nov. 1993.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 681-687, July 2008.

RYDER, C.; BYRD, M.; WOZNIAK, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 10, n. 6, p. 644-648, Dec. 2007.

SALGADO, S. M. L. et al. Ecloração e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* em óleos essenciais. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 17-22, jan./mar. 2003.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, Mar. 2001.

SANTANA, K. C. et al. Teores de bixina em urucum (*Bixa orellana*) 'Piave Vermelha', em diferentes acondicionamentos e temperaturas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 2, n. 1, p. 19-22, mar. 2008.

SCHMID, M. W. et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, n. 1, p. 1-18, Jan. 2005.

SENEVIRATNE, C. J. et al. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 54, n. 11, p. 1052-1060, Nov. 2009.

SHAFABI, M.; VAFAI, K. Biofilm affected characteristics of porous structures. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, Oxford, v. 52, n. 3/4, p. 574-581, Jan. 2009.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 2, p. 407-413, Aug. 2009.

SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular interaction in biofilms. **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 859-871, Aug. 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2007. 1102 p.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 309-316, Dec. 2008.

_____. Review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 1, p. 573-583, Jan. 2010.

_____. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, New York, v. 43, n. 1, p. 229-237, Jan. 2009.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 9, p. 389-397, Nov. 2006.

SOUZA, E. L. et al. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2/3, p. 308-311, Feb. 2010.

STOODLEY, P. et al. Biofilm as complex differentiated communities. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, Nov. 2002.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, New York, v. 147, n. 1, p. 3-9, Jan. 2001.

TEBALDI, V. M. R. **Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle de *Pseudomonas* sp. e na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa***. 2008. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 119, n. 6, p. 3-10, June 2006.

TRESSE, O. et al. Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 53-62, July 2006.

UKPABI, U. J. et al. Physico-chemical characteristics of tumeric genotypes cultivated in Nigeria as potential sources of commercial colourants. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 9-13, Jan. 2008.

VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 496-506, Oct. 2008.

VILLENA, G. K. et al. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 6, p. 1920-1926, Mar. 2010.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 7, p. 727-733, July 1996.

ZACARIAS, G. D. et al. Porosity and tortuosity relations as revealed by a mathematical modelo biofilm structure. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 233, n. 2, p. 245-251, Mar. 2005.

CAPÍTULO 2

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS DE *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana*
L. SOBRE *Pseudomonas aeruginosa* E *Listeria monocytogenes***

RESUMO

No Brasil há várias pesquisas que enfatizam a existência de diferentes componentes químicos entre os óleos essenciais de diferentes espécies e variedades de plantas. Objetivou-se nesse estudo identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais de folhas secas de açafraão e urucum, verificar sua ação bactericida sobre *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, determinando a concentração mínima inibitória dos óleos sobre cada bactéria, e avaliar o modo de ação dos óleos sobre as células planctônicas por meio da MET. Utilizando-se do processo de hidrodestilação para obtenção dos óleos essenciais, pode-se observar que o rendimento dos óleos foi de 2,78 e 0,21%, enquanto que a umidade das folhas secas de açafraão e de urucum foi de 13% e 10,6%, respectivamente. No óleo essencial das folhas de açafraão foram observados 17 constituintes químicos, sendo identificados 88,23% deles, tendo como majoritários α -felandreno (41,07%), terpinoleno (27,38%), 1,8-cineol (7,70%), β -pineno (4,79%) e limoneno (3,04%). Enquanto que no óleo essencial da folha de urucum foram encontrados 28 constituintes químicos, sendo identificados 75% deles, dos quais α -humuleno (43,01%), E-nerolidol (14,40%) e espatulenol (7,57%) foram os constituintes químicos majoritários. A concentração mínima inibitória dos óleos essenciais foi de 0,5% sendo que os óleos essenciais, quando em sinergismo, na concentração de 5% apresentou maior halo de inibição, para *Pseudomonas aeruginosa* (14,67mm). Os óleos essenciais de folhas secas de açafraão, urucum e sinergismo são ativos contra o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: Ação bactericida. Açafraão. Urucum.

ABSTRACT

In Brazil there are various research works that emphasize the existence of different chemical components among the essential oils of different species and varieties of plants. This study aimed to identify the chemical constituents of the essential oils of dry leaves of turmeric and annatto, to verify their bactericidal action on *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*, determining the minimum inhibitory concentration of the oils on each bacterium and to evaluate the action mechanism of the oils on the planktonic cells through MET. Hydrodistillation process was adopted to obtain the essential oils, and in the process we can observe that the yield of the oils was 2.78 and 0.21%, while the moisture of the dry turmeric and annatto leaves was 13% and 10.6%, respectively. In the essential oil of the turmeric leaves 17 chemical constituents were observed and 88.23% were identified. The majority components were: α -phellandrene (41.07%), terpinolene (27.38%), 1,8-cineol (7.70%) β -pinene (4.79%) and limonene (3.04%). Twenty-eight chemical constituents were found while in the essential oil of the annatto leaf and 75% of them were identified, of which α -humulene (43.01%), E-nerolidol (14.40%) and spathulenol (7.57%) were the majority chemical components. The minimum inhibitory concentration of the essential oils was 0.5%, and the essential oils, when in synergism at the concentration of 5%, presented the largest inhibition halo for *Pseudomonas aeruginosa* (14.67mm). The essential oils of dry leaves of turmeric, annatto and synergism are active against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Bactericidal action. Turmeric. Annatto.

1 INTRODUÇÃO

A investigação de novos agentes antimicrobianos tem ganhado destaque na última década devido, principalmente, ao declínio do número de novos fármacos aprovados e à perda iminente da proteção das patentes. Além disso, observa-se o aumento do número de bactérias resistentes a agentes sanificantes utilizados tanto na área médica quanto na indústria de alimentos (LI; VEDERAS, 2009).

Os extratos de plantas superiores foram e ainda são muito utilizados para a obtenção de substâncias com ação antimicrobiana. No entanto, muitas vezes sua baixa concentração no extrato inviabiliza os processos de purificação ou a ação sinérgica dos diferentes compostos, causando grandes problemas às indústrias. Visando diminuir parâmetros envolvidos no isolamento e purificação de compostos, os óleos essenciais vêm sendo estudados. Estes apresentam elevada eficiência antimicrobiana e em concentrações adequadas são considerados seguros (GRAS) (DIMITRIJEVIC et al., 2007).

Na atualidade são conhecidos óleos essenciais de aproximadamente 3000 plantas, sendo comercializados em torno de 300. Há inúmeros conglomerados internacionais que negociam óleos essenciais, os mais importantes emprega-os como matéria-prima para a produção de aromas e fragrâncias, podendo ainda ser utilizados nas indústrias de alimentos e na agricultura, com mercado apresentando crescimento acima de 11% ao ano (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Várias plantas são utilizadas para a extração de óleos essenciais, sendo que alguns estudos demonstraram que aqueles originários de orégano, tomilho e alecrim estão entre os mais ativos antimicrobianos (DIMITRIJEVIC et al., 2007), isso se deve principalmente pela presença de compostos majoritários

como o timol e o carvacrol, substâncias com elevada atividade microbiana (LIOLIOS et al., 2009).

Na literatura é bem definido que os óleos essenciais contendo compostos fenólicos como majoritários possuem maiores atividades antimicrobianas (BURT, 2004), no entanto a atividade antimicrobiana pode também estar atribuída a compostos terpênicos (LIOLIOS et al., 2009).

Em busca de novos compostos com elevada atividade antimicrobiana, os óleos essenciais de várias plantas estão sendo analisados quantitativamente e qualitativamente, dentre elas têm-se o açafrão e o urucum. Todavia, apenas os rizomas de açafrão e sementes de urucum têm sido foco de estudos. Na literatura há poucas referências sobre a atividade antimicrobiana de folhas de açafrão e urucum, no entanto alguns estudos mostram que os componentes majoritários dos óleos essenciais desses vegetais pertence à classe dos terpenos, cuja atividade bactericida é comprovada.

O potencial biocida de um óleo ou de seus componentes varia de acordo com as características fisiológicas do microrganismo, fato sustentado por diversos trabalhos que mostram que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis aos óleos essenciais do que as Gram-negativas. As bactérias *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentam resistência a uma variedade de sanificantes sendo consideradas de grande importância na área alimentícia e/ou médica, podendo causar desde perdas econômicas até problemas relacionados à saúde pública.

Os objetivos deste estudo foram identificar os constituintes químicos dos óleos essenciais de folhas secas de *Curcuma longa* L. (açafrão) e *Bixa orellana* L. (urucum); determinar o teor de umidade e rendimento dos óleos essenciais das folhas secas; verificar a ação bactericida dos óleos essenciais sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 determinando a concentração mínima inibitória dos óleos sobre cada

bactéria; e, avaliar o efeito dos óleos sobre as células planctônicas por meio da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química, Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e Laboratório de Microscopia e Análise Ultra Estrutural da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas a extração dos óleos essenciais, a determinação da concentração mínima inibitória e análise de microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente. A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada na Universidade Federal de Sergipe.

2.1 Matéria-prima e extração dos óleos essenciais

Folhas frescas de *Curcuma longa* L. (Açafrão) e *Bixa orellana* L. (Urucum) foram obtidas de culturas da região de Mara Rosa (GO) e Presidente Olegário (MG), respectivamente. Após coletadas, as amostras foram secas à sombra em temperatura ambiente e transportadas em sacos de papel até o Laboratório de Química.

Os óleos essenciais foram obtidos pela técnica de hidrodestilação, utilizando um destilador de Clevenger modificado, por duas horas.

Os óleos essenciais foram separados da água (hidrolato) utilizando-se as técnicas de rotoevaporação (urucum) e centrifugação (açafrão). No processo de rotoevaporação, o hidrolato foi particionado com diclorometano (1/3 do volume do hidrolato) em funil de separação, para eliminação da fase aquosa e recuperação do óleo essencial, operação que foi realizada por três vezes. A fase orgânica foi acrescida de sulfato de sódio anidro, deixada em repouso e filtrada em papel de filtro. Posteriormente, o material filtrado foi evaporado em um evaporador rotatório sob pressão entre 200-300 mmHg a 40 °C. Para a retirada

do restante do diclorometano foi utilizada uma pistola de secagem. No processo de separação por centrifugação foi utilizada uma centrífuga de cruzeta horizontal 965,36 x G por 5 min. O óleo essencial obtido foi armazenado em vidros âmbar envoltos com papel alumínio e estocados em temperatura de refrigeração.

O rendimento do óleo essencial foi expresso em % volume/massa, ou seja, volume (mL) de óleo essencial por massa (g) de material vegetal seco.

Paralelamente foi realizado o teste de umidade, segundo Pimentel et al. (2008), em que foram adicionados, em balão volumétrico de 250 mL, 5 g da amostra e 80 mL de ciclohexano. Após duas horas de ebulição o volume de água obtido foi medido e calculado o teor de umidade.

Todo procedimento foi realizado em triplicata.

2.1.1 Identificação e quantificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais

Para a avaliação qualitativa dos óleos essenciais, estes foram submetidos à cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), utilizando o aparelho Shimadzu modelo CG-17A, com detector seletivo de massa modelo QP 5000. As condições operacionais foram: coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB5 (30m X 0,25 mm), gás carreador utilizado hélio a uma vazão de 1mL/min, temperaturas de 220 °C no injetor e 240 °C no detector, programação da coluna e temperatura inicial 40 °C com acréscimo de 3 °C a cada minuto.

Os compostos foram identificados por comparações com espectros existentes na biblioteca (Wiley, 229) e pelo índice Kovat's (ADAMS, 1995).

Para avaliação quantitativa foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo 17A, acoplado a um detector de ionização de chama de hidrogênio (FID), coluna capilar DB5. O gás carreador foi o nitrogênio, a uma

vazão de 2,2mL/min, taxa split 1:10 e volume injetado de 1µL. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 °C e 240 °C, respectivamente, com pressão da coluna de 115KPa. Foram realizadas três injeções para cada óleo testado, obtendo-se a concentração média e o desvio padrão para cada constituinte, sendo a quantificação obtida por meio de normalização da área.

2.2 Microrganismos padrões

As bactérias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. As culturas estoque foram armazenadas 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).

2.2.1 Obtenção do inóculo

A reativação das cepas foi realizada inoculando-se 10 µL de cada cultura em tubos contendo 3 mL de caldo TSB (*Tryptone Soy Broth*) e incubados, por 24 horas, a 37 °C. Após a incubação, foram retirados 10 µL dos inóculos e transferidos para 200 mL de caldo TSB. O número de células por mL, de cada cultura, foi quantificado utilizando-se a curva padrão. As culturas bacterianas foram padronizadas para cerca de 10⁷ UFC/mL.

2.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A metodologia empregada foi a difusão cavidade em Ágar (BAUER et al., 1966) com modificações, empregando-se para tal TSA (Ágar tripticase de soja) acrescida de 0,5% de Tween 80. Inicialmente, foi adicionada uma fina

camada de ágar sobre placas de Petri com diâmetro de 140 mm e solidificado em câmara de fluxo laminar a temperatura ambiente. Sobre o meio sólido foram acomodadas 9 esferas de vidro estéreis com diâmetro de 3 mm e volume de 7 mm³.

O meio de cultura, TSA acrescido de 0,5 de Tween 80, foi inoculado com a cultura padronizada (10^7 UFC/mL) e depositado sobre a camada de ágar sólido. Após a solidificação, as esferas foram retiradas e, posteriormente, os *slots* formados foram preenchidos com 8 µL de óleo essencial, nas diferentes concentrações. As diluições dos óleos de açafraão, urucum e sinergismo foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se as concentrações de 10%, 5%, 2,5%, 1,5% e 0,5%. Para verificar o efeito do DMSO sobre as bactérias, esse foi utilizado como controle a 100%. O procedimento foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse intervalo, a mensuração dos halos de inibição formados foi realizada com paquímetro digital (NEDOROSTOVA et al., 2009) com modificações.

2.4 Avaliação da atuação dos óleos essenciais sobre os microrganismos por Microscopia eletrônica de transmissão

Após a padronização das culturas, alíquotas de 1 mL de cada uma foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 5000 rpm por 5 min. O pelet foi tratado com os óleos essenciais e sua mistura na concentração de 0,5% por 15 min. Após esse período, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado; os pelets foram emblocados pela adição de 0,5 mL de agarose 1,5%.

Os blocos de agarose contendo as células foram imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado), pH 7,2, pelo período de 48 horas. Após este período, os blocos foram lavados com tampão cacodilato por três vezes de 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em água, por 1 hora. Posteriormente foi realizada a lavagem dos blocos, por três vezes, em água

destilada. Para aumentar o contraste, as amostras foram colocadas em acetato de uranila 0,5% e deixadas overnight a temperatura de refrigeração. Após esse período, foram desidratados em etanol (25%, 50%, 70% e 90% por 10 min.; 99,9% por duas vezes de 10 min.). O material foi incluído em resina Spurr a 30%, 70% e 100% e, após a inclusão, levado à estufa a 70 °C por 24 horas. Antes de ser seccionado, o bloco foi desbastado e nele realizado um corte de formato trapezoidal com base maior de aproximadamente 1,5 mm. Após o desbaste, foram obtidos cortes semi e ultrafinos utilizando-se navalhas de diamante presas ao ultramicrótomo. As secções semifinas, que tinham entre 0,025 e 0,5 μ , foram transferidas para uma lâmina contendo uma gota de água destilada e coradas com azul de toluidina. Secções ultrafinas de coloração dourada (100 nm) foram coletadas com auxílio de telinha contendo filme plástico de *formvar*, secas em papel de filtro. As secções foram pós-contrastadas em acetato de uranila, seguido por acetato de chumbo por três minutos cada e, na sequência, examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, a 80kv (ALVES, 2004).

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento em blocos casualizados.

As análises estatísticas foram realizadas com o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) em que utilizou-se de análise de variância por meio do teste F para verificar a diferença entre os tratamentos. Quando significativo a comparação de médias para os óleos e suas concentrações foram realizadas por meio do teste de Scott e Knott (1974).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química dos óleos essenciais

No Brasil há várias pesquisas que enfatizam a existência de diferentes componentes químicos entre os óleos essenciais de diferentes espécies e variedades. Óleos essenciais obtidos de rizomas de *Curcuma longa* L. e sementes de *Bixa orellana* L., têm sido alvo de várias pesquisas, no entanto poucos são os relatos referentes a óleos essenciais de folhas desses vegetais.

Utilizando-se do processo de hidrodestilação para obtenção dos óleos essenciais de folhas secas de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L., pode-se observar que existe grande variação na umidade e rendimento. A umidade das folhas secas de *Curcuma longa* L. e de *Bixa orellana* L. foi de 13,2% e 10,6%, enquanto que o rendimento dos óleos foi de 2,78 e 0,21%, respectivamente.

De acordo com Natta et al. (2008) tais diferenças são geralmente em função das características genéticas, da idade da planta e do ambiente. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) a época em que uma planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não são constantes durante o ano. A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas, também, as proporções relativas dos componentes da mistura.

As Tabelas 1 e 2 mostram os componentes químicos dos óleos essenciais das folhas de açafrão e urucum, identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (EG/EM).

Tabela 1 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)

Composto	Tempo de retenção	IK _T	IK _C	Nome
1	4,129	804	824	Butanoato de etila
2	7,701	939	933	α -pineno
3	9,217	979	979	β -pineno
4	9,565	990	990	Mirceno
5	10,261	1002	1010	α -felandreno
6	10,317	1011	1011	δ -3-careno
7	10,594	1017	1019	α -terpineno
8	10,894	1026	1027	o-cimeno
9	11,056	1029	1031	Limoneno
10	11,189	1031	1035	1,8-cineol
11	12,126	1059	1060	γ -terpineno
12	13,192	1088	1089	Terpinoleno
13	13,669	1096	1101	Linalol
14	17,038	1182	1191	p-cimen-8-ol
15	17,342	1188	1199	α -terpineol

IK_T: Índice de Kovat's tabelado; IK_C: Índice de Kovat's calculado

Tabela 2 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Bixa orellana* L. identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM)

Composto	Tempo de retenção	IK _T	IK _C	Nome
1	4,127	804	823	Butanoato de etila
2	7,695	939	933	α -pineno
3	9,207	979	979	β -pineno
4	23,769	1376	1379	α -copaeno
5	24,218	1390	1391	β -elemeno
6	25,301	1419	1424	E-cariofileno
7	26,169	1447	1450	Myrtayl-4(12)-ene
8	26,547	1454	1461	α -humuleno
9	27,035	1466	1476	Ishwarano
10	27,336	1485	1485	Germancreno D
11	27,455	1488	1489	Aristolocheno
12	27,711	1497	1496	Valenceno
13	27,879	1495	1502	γ -amorfeno
14	28,493	1523	1522	δ -cadineno
15	28,601	1522	1525	7-epi- α -selineno
16	29,776	1563	1563	E-nerolidol
17	30,435	1578	1584	Espatulenol
18	31,969	1636	1635	Cadin-4-en-7-ol
19	32,439	1642	1651	Epi- α -muurolol
20	32,921	1660	1667	Neo-intermedeol
21	33,076	1671	1672	Bulnesol

IK_T: Índice de Kovat's tabelado; IK_C: Índice de Kovat's calculado

No óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* L. foram isolados 17 constituintes químicos, sendo identificados 88,23% deles, tendo como majoritários α -felandreno (41,07%), terpinoleno (27,38%), seguidos de 1,8-cineol (7,70%), β -pineno (4,79%) e limoneno (3,04%), pertencentes à classe dos monoterpenos. No óleo essencial da folha de *Bixa orellana* L. foram

encontrados 28 constituintes químicos, sendo identificados 75% deles, dos quais α -humuleno (43,01%), E-nerolidol (14,40%) e espatulenol (7,57%) foram os constituintes químicos majoritários, pertencentes à classe dos sesquiterpenos.

Em estudo realizado por Behura, Sahoo e Srivastava (2002) foram encontrados os componentes químicos de óleos essenciais de folhas de *Curcuma longa* L. extraídos por hidrodestilação α -felandreno (38,24%), C₈-aldeído (20,58%), 1,8-cineol (8,64%), α -pineno (2,88%) e β -pineno (2,36%), sabineno (0,40%), mirceno (1,17%), p-cimeno (6,05%), linalol (0,58%), cariofileno (0,70%), geraniol (1,77%) e metil-heptanone (0,05%). Tripathi et al. (2002) encontraram como constituintes majoritários o mirceno (40,19%), p-cimeno (23,05%) e 1,8-cineol (13,16%); seguidos de α -pineno (1,83%), β -pineno (3,42%), γ -terpineno (2,03%), terpenoleno (0,11%), linalol (1,37%), p-cimeno-8-ol (0,17%), mirtenal (0,53%), ar-turmerona (0,71%), α -turmerona (3,0%) e β -turmerona (1,06%). Os autores comentaram que os óleos eram constituídos de 82,9% e 16,3% de monoterpenos, nas folhas e rizomas frescos, respectivamente.

Em estudos fitoquímicos com sementes de *Bixa orellana* L. foi observada a presença de vários derivados de carotenóides (incluindo bixina e norbixina), alguns terpenóides, tocotrienóis, arenas e flavonóides (incluindo luteolina e apigenina); nas folhas, bisulfatos de flavonóides e sesquiterpenos, sendo o majoritário o ishwaranol; nas raízes, o triterpeno ácido tomentósico (SHILPI et al., 2006).

3.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L., *Bixa orellana* L. e seu sinergismo sobre *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa* foram qualitativamente e quantitativamente analisadas avaliando-se a presença e o diâmetro do halo de inibição.

Na Tabela 3 pode-se observar que os óleos essenciais e suas misturas apresentaram atividade antibacteriana sobre *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*. De acordo com análise de variância por meio do teste F, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação aos óleos e concentrações sobre *P. aeruginosa*, sendo o óleo em combinação melhor do que o óleo de urucum e açafrão, de acordo com o teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância (APÊNDICE A).

Para *L. monocytogenes* apenas o efeito da concentração foi significativo, sendo que os óleos de açafrão, urucum e suas combinações apresentaram o mesmo comportamento (APÊNDICE B).

Tabela 3 Valores médios do tamanho dos halos em diferentes concentrações de *Curcuma longa* L., *Bixa orellana* L. e o sinergismo

(%)	Diâmetro da zona de inibição (mm)					
	<i>P. aeruginosa</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
	Açafrão	Urucum	Sinergismo	Açafrão	Urucum	Sinergismo
Controle	0,00 a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
0,5	0,83a	6,50b	1,50 ^a	2,33b	1,83b	2,33b
1,5	0,83a	4,00b	2,67 ^a	2,50b	2,17b	1,83a
2,5	0,83a	3,00b	7,67b	2,50b	2,17b	2,67b
5,0	2,00a	4,67b	14,67b	2,33b	2,50b	3,67b
10,0	0,83a	0,00a	9,83b	2,17b	3,00b	2,83b

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Avaliando a ação antimicrobiana de cada óleo essencial, os maiores halos de inibição para açafrão foram encontrados nas concentrações de 5% (2,00

mm) e 1,5 e 2,5 (2,5 mm), enquanto que de urucum foram nas concentrações de 0,5% (6,50 mm) e 10% (3,0 mm), para *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes*, respectivamente. Os óleos essenciais quando em combinação, na concentração de 5%, promoveram a formação de maior halo de inibição, com diâmetro de 14,67 mm para *P. aeruginosa* e 3,67 mm para *L. monocytogenes*.

O óleo essencial de folhas de açafrão teve terpenos como compostos preponderantes, sendo o α -felandreno encontrado como composto majoritário. Plantas que contêm esse composto como majoritário e outros terpenos apresentam elevado potencial antimicrobiano. Entretanto, nesse estudo o óleo essencial de folha de açafrão não foi muito efetivo contra *P. aeruginosa* nem *L. monocytogenes*.

Segundo Jiang, Timmermann e Gang (2006) os principais responsáveis pelas atividades biológicas e medicinais de rizomas de açafrão são os diarileptanóides representados pela curcumina, desmetoxicurcumina e bidesmetoxicurcumina e os sesquiterpenos.

Trabalhos realizados com extrato alcoólico do rizoma de açafrão mostram que esse tem efeito bactericida sobre *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes* (BARA; VANETTI, 1998); já o óleo essencial de rizoma de *Curcuma longa* L. inibiu o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus*, apresentando halo de inibição de 16 mm, 9 mm e 10 mm, respectivamente e, em contrapartida, não foi capaz de inibir *E. coli* (NATTA et al., 2008).

Pouco se encontra na literatura sobre o óleo essencial de folhas de urucum, uma vez que a planta é perene e seu cultivo ocorre devido à exploração das sementes. Contudo, estudos fitoquímicos mostram que nas folhas são encontrados mono e sesquiterpenos, sendo o composto majoritário o ishwarano (LORENZI; MATOS, 2002; SHILPI et al., 2006). Nesse estudo o componente principal foi o α -humuleno pertencente à classe dos sesquiterpenos que, de

acordo com Jirovetz et al. (2006) possui ação bactericida sobre *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas, mas ineficiente contra *S. aureus*.

Resultado de estudo realizado por Coelho et al. (2003) revelou que *Pseudomonas aeruginosa* tratada com tintura preparada a partir de folhas frescas de urucum apresentou maior halo de inibição ($11,1 \pm 1,7$) do que as tratadas com tinturas preparadas de órgãos frescos como caule ($7,6 \pm 2,7$), flor ($4,6 \pm 1,7$), frutos verdes ($8,5 \pm 0,9$) e raiz ($6,8 \pm 0,7$). Tais resultados mostram que *P. aeruginosa* apresentou grande sensibilidade aos componentes existentes nas folhas de urucum. Entretanto, *P. aeruginosa* apresentou resistência a extrato hidroalcoólico de sementes de urucum a 10% (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída principalmente aos seus compostos majoritários (BAKKALI et al., 2008). Entretanto, existem evidências de que componentes minoritários têm importante papel na atividade antimicrobiana do óleo, promovendo ação sinérgica entre os demais (BURT, 2004). Alguns estudos têm concluído que os óleos essenciais têm maior atividade antibacteriana quando em sinergismo, pois um componente pode ter efeito mínimo quando isolado e quando em combinação pode ter seu efeito potencializado, tal fato também foi observado neste estudo.

Pode-se observar que para *P. aeruginosa* houve efeito sinérgico entre os óleos, efeito notado também para *L. monocytogenes* em menor intensidade. A 5% de cada óleo houve o maior efeito antimicrobiano da mistura dos óleos sobre *P. aeruginosa*, ou seja, o maior efeito sinérgico entre os óleos.

O estudo da ação antimicrobiana de óleo essencial de *Litsea nakaii* mostra que esse foi efetivo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo mais efetivos sobre as Gram-positivas, principalmente *S. aureus*. Os compostos majoritários desse óleo foram o α humuleno (15,5%), δ -cadineno (9,2%), δ -selineno (7,1%), viridifloreno (4,7%) e α -muuroleno (4,3%) (HO et

al., 2009). Contudo, o α -humuleno não apresenta atividade biocida quando avaliado sobre *S. aureus* (JIROVETZ et al., 2006). Assim, esses estudos mostram que, embora o composto majoritário seja de grande importância, os outros compostos também têm papel importante.

Outro composto encontrado no óleo de folha de urucum com atividade antimicrobiana comprovada foi o E-nerolidol. Este composto é usado em pequenas quantidades em vários enxaguantes bucais, como flavorizante e antimicrobiano, sendo também empregado como componente sinérgico em sanificante à base de amônio quaternário (UNITED STATES PATENT, 2002).

Buscando melhor entendimento da ação dos óleos essenciais empregados e suas misturas sobre a estrutura de *P. aeruginosa* (Figura 1) e *L. monocytogenes* (Figura 2) foram analisadas eletromicrografias de transmissão das células.

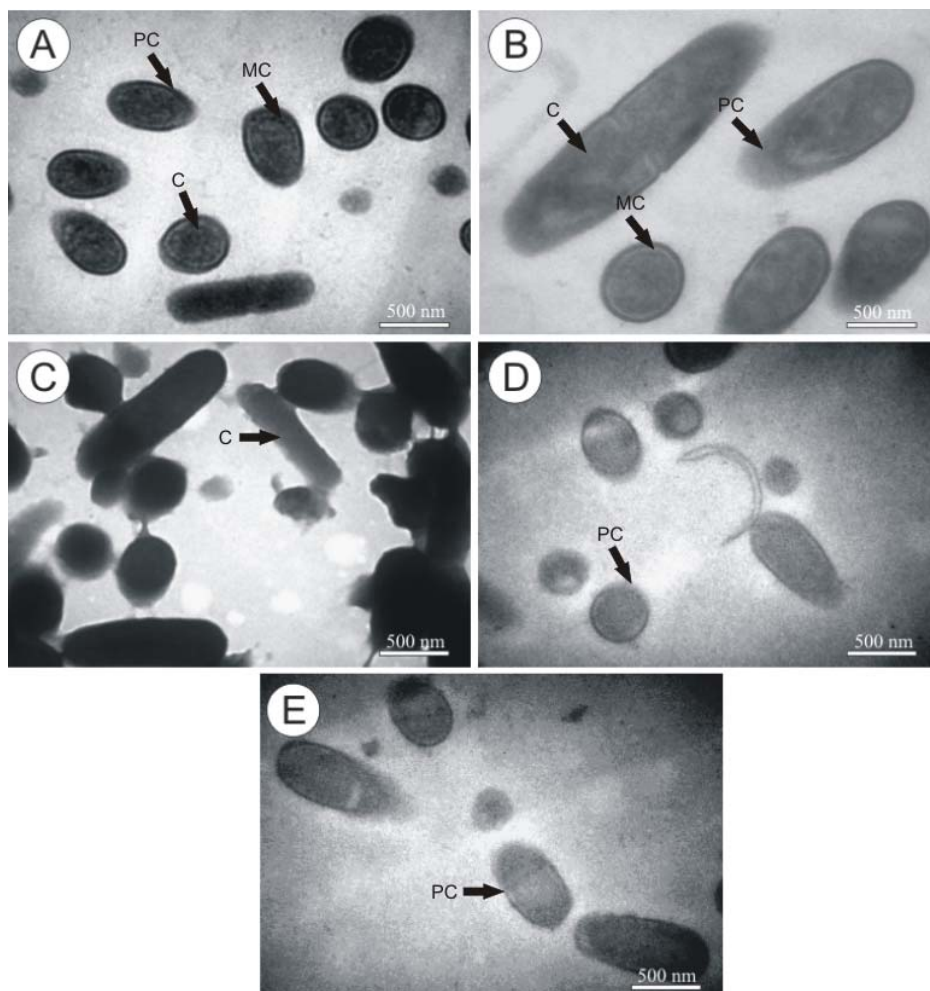


Figura 1 Eletromicrografia de transmissão de *Pseudomonas aeruginosa* exposta a óleos essenciais na concentração de 0,5%. Controle (A), Célula bacteriana exposta ao DMSO (B); Açafrão (C); Urucum (D) e Urucum + Açafrão - Sinergismo (E). PC (Parede celular); C (Citoplasma); MC (Membrana citoplasmática).

Cultura de *P. aeruginosa* foi tratada com DMSO (Figura 1B) buscando-se avaliar possíveis danos estruturais às células causadas pelo diluente utilizado no experimento, contudo ao se comparar com as células não tratadas (Figura 1A)

não foi observada nenhuma alteração tanto no conteúdo citoplasmático como na parede celular. Por outro lado, após o tratamento das células com os óleos essenciais de açafraão, urucum e suas misturas observou-se alteração da estrutura celular (Figuras 1C, 1D e 1E). Verificou-se que o maior dano foi causado pelo óleo essencial de açafraão (Figura 1C), uma vez que houve perda da parede celular e aparente alteração na densidade do citoplasma, além de as células se disporem umas próximas as outras. O tratamento com óleo essencial de urucum (Figura 1D) e o sinergismo (Figura 1E) causou apenas ruptura da parede celular e danos na membrana citoplasmática.

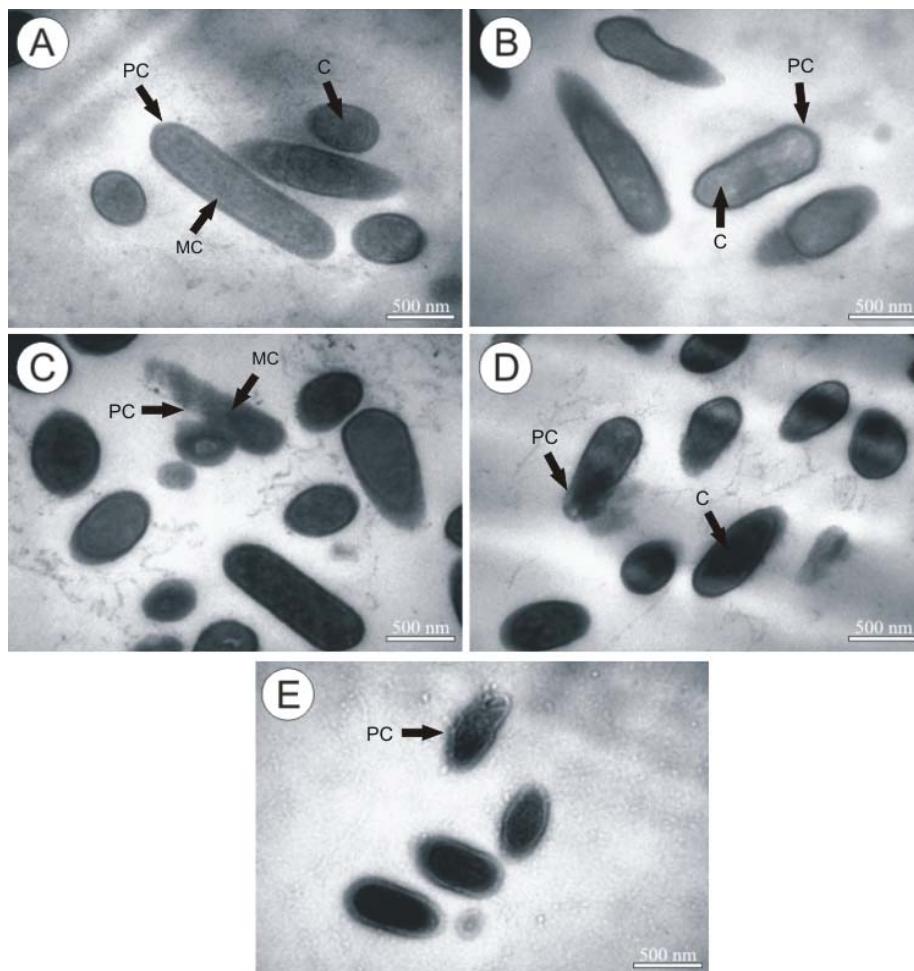


Figura 2 Eletromicrografia de transmissão de *Listeria monocytogenes* exposta a óleos essenciais na concentração de 0,5%. Controle (A), Célula bacteriana exposta ao DMSO (B); Açafrão (C); Urucum (D) e Urucum + Açafrão - Sinergismo (E). PC (Parede celular); C (Citoplasma); MC (Membrana citoplasmática).

O comportamento das células de *L. monocytogenes* quando tratada com DMSO (Figura 2B) foi semelhante ao de *P. aeruginosa*, não se observando nenhuma alteração na integridade celular quando comparada com as células não

tratadas (Figura 2A). Após os tratamentos com os óleos essenciais e sua mistura foram observados danos na parede celular (Figuras 2C, 2D e 2E) e, como consequência, pôde-se observar extravasamento do conteúdo citoplasmático, com coagulação de parte dele. Este fato foi observado nas células tratadas com açafraão (Figura 2C) e urucum (Figura 2D).

O óleo essencial da folha de açafraão parece interagir com a parede celular das células de *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* promovendo sua lise parcial. Resultado semelhante foi encontrado para *Pseudomonas fluorescens* que, após tratamento com cinnamaldeído e limoneno, apresentam modificações externas, devido, provavelmente, à penetração desses compostos no envelope celular (DI PASQUA et al., 2007). Da mesma forma, o óleo essencial de folhas de urucum também atuou na parede celular de ambas as células.

Sabe-se que *P. aeruginosa* possui baixa susceptibilidade a agentes antimicrobianos com diversas estruturas e funcionalidades. Vários mecanismos podem estar relacionados a essa característica da bactéria incluindo a redução da permeabilidade dos compostos na membrana externa e seu sistema de efluxo muito ativo. Em estudo realizado por Longbottom et al. (2004) fica claro que a membrana externa a protege do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e de seus componentes, nos quais processos dependentes de energia estão envolvidos. Os autores ainda sugerem que processos de efluxo podem estar envolvidos. Já *L. monocytogenes* parece ter seu processo de utilização de glicose inibido em presença de eugenol (GILL; HOLLEY, 2004).

Di Pasqua et al. (2007) mostraram que o timol, carvacrol, limoneno, cinamaldeído e eugenol apresentaram elevada interação com a parede celular e membrana citoplasmática de várias bactérias, promovendo alterações estruturais. Assim, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais não está atribuída a um mecanismo específico. Devido ao seu caráter lipofílico, passa através da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo as estruturas das diferentes

camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos, tornando-a mais permeável, o que ocasiona a perda de íons e a redução do potencial da membrana, no colapso da força próton motiva, alteração do fluxo de elétrons e na atividade de transporte, além de permitir a ligação de macromoléculas e lise celular (BURT, 2004). Os óleos essenciais podem ainda coagular o citoplasma e danificar lipídios e proteínas (BAKKALI et al., 2008). Neste estudo foi possível observar a coagulação dos constituintes celulares de *L. monocytogenes* quando tratada com urucum.

Segundo Gardini et al. (2009) bactérias Gram-negativas apresentam maior resistência a alguns agentes antimicrobianos e tal mecanismo está atribuído, principalmente, à membrana externa que age como eficiente barreira contra macromoléculas e substâncias hidrofóbicas, bem como ao maior conteúdo de ácidos graxos ciclopropânicos da membrana interna.

Os resultados revelados pelas eletromicrografias corroboram dados encontrados na literatura, que mencionam que um dos principais efeitos causados por óleos essenciais são danos na parede celular. Vale ressaltar que o modo de ação de cada óleo está relacionado diretamente aos constituintes presentes e estruturas das células.

Na literatura há carência de estudos que aplicam a microscopia eletrônica de transmissão como instrumento para analisar o efeito de óleos essenciais sobre bactérias. Muitos desses estudos ainda são realizados utilizando a microscopia eletrônica de varredura, mas somente a MET fornece dados precisos sobre tais efeitos. Dessa maneira, pode-se dizer que a microscopia eletrônica de transmissão utilizada nesse estudo é uma ferramenta adicional e importante para estudo dessa atividade.

4 CONCLUSÃO

A concentração mínima inibitória dos óleos essenciais foi de 0,5%, sendo que os óleos essenciais quando em sinergismo, na concentração de 5%, apresentou maior halo de inibição, para *Pseudomonas aeruginosa*.

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu observar as alterações causadas às células quando expostas a óleos essenciais de açafrão, urucum e sinergismo na concentração de 0,5%.

Os óleos essenciais de folhas secas de açafrão, urucum e sinergismo foram ativos contra o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allure, 1995. 469 p.

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2004. 43 p.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BARA, M. T. F.; VANETTI, M. C. D. Estudo da atividade antimicrobiana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 7/8, n. 1, p. 22-34, mar. 1998.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinic Pathology**, Baltimore, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEHURA, S.; SAHOO, S.; SRIVASTAVA, V. K. Major constituents in leaf essential oils of *Curcuma longa* L. and *Curcuma aromatica* Salisb. **Current Science**, Bangalore, v. 83, n. 11, p. 1-2, Dec. 2002.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.

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.

COELHO, A. M. S. P. et al. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 47-54, jan./dez. 2003.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, June 2007.

DIMITRIJEVIC, S. I. et al. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 2, p. 774-782, Apr. 2007.

GARDINI, F. et al. Composition of four essential oils obtained from plants from Cameroon, and their bactericidal and bacteriostatic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, Nigeria, v. 3, n. 5, p. 264-271, May 2009.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, Oct. 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set. 2005.

HO, C. L. et al. Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Litsea nakaii* from Taiwan. **Natural Product Communication**, Westerville, v. 4, n. 6, p. 865-868, Dec. 2009.

JIANG, H.; TIMMERMANN, B. N.; GANG, D. R. Use of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizome. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1111, n. 1, p. 21-31, Apr. 2006.

JIROVETZ, L. et al. Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and factory evaluation of an essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.) from Bavaria and some of its main compounds. **Scientia Pharmaceutica**, Vienna, v. 74, n. 4, p. 189-201, 2006.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, New York, v. 325, n. 5937, p. 161-165, July 2009.

LIOLIOS, C. C. et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, n. 1, p. 77-83, Jan. 2009.

LONGBOTTOM, C. J. et al. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Birmingham, v. 54, n. 2, p. 386-392, July 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 511 p.

NATTA, L. et al. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. **International Food Research Journal**, Selangor, v. 15, n. 3, p. 337-346, 2008.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 157-160, Feb. 2009.

PIMENTEL, F. A. et al. **Método para determinação de umidade de plantas romáticas**. Fortaleza: EMBRAPA, 2008. 4 p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 14 ago. 2010.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SHILPI, J. A. et al. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 108, n. 2, p. 264-271, June 2006.

TRIPATHI, A. K. et al. Bioactivities of the leaf essential oil of *Curcuma Longa* (Var.Ch-66) on three species of stored-product beetles(Coleoptera). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 95, n. 1, p. 183-189, Jan. 2002.

UNITED STATES PATENT. Elias A. Shaheen; Judy Y. Ikawa; Robert L. Blum. **Enhanced antimicrobial composition**. US n. B1 6361787, 26 mar. 2002.

CAPÍTULO 3

**APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Curcuma longa* L.
(AÇAFRÃO) E *Bixa orellana* L. (URUCUM) NO CONTROLE DE
BIOFILME FORMADO POR *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e
Pseudomonas aeruginosa ATCC 25853 EM SUPERFÍCIE DE
POLIPROPILENO**

RESUMO

Em ambientes naturais microrganismos são comumente encontrados em associações com a superfície e interface, formando agregados celulares embebidos em uma matriz polimérica que eles mesmos produzem, denominada de biofilme. Em superfície de contato com alimento os biofilmes são recalcitrantes fontes de contaminação, no entanto a aplicação de antimicrobianos naturais é considerada uma eficiente alternativa no controle de biofilmes. Objetivou-se avaliar o potencial de formação de biofilme das bactérias *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em superfície de polipropileno, quando cultivadas em TSB; avaliar o potencial bactericida dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. separadamente e combinados, no biofilme maduro; e, avaliar por microscopia eletrônica de varredura aspectos morfológicos do biofilme maduro, bem como a ação dos óleos essenciais sobre o mesmo. *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* foram cultivadas em TSB a 37 °C e submetidas ao processo de formação de biofilme na superfície de polipropileno. As células aderidas foram tratadas com óleos essenciais de açafrão, urucum e sinergismo na concentração de 0,5%, sobre diferentes tempos de contato. Houve crescimento satisfatório de ambas as bactérias no TSB que, no entanto não foram capazes de formar biofilme na superfície de polipropileno. Os óleos essenciais inibiram completamente o crescimento de *L. monocytogenes* na superfície de polipropileno, enquanto que *P. aeruginosa* mostrou-se resistente ao óleo essencial de açafrão por 15 minutos e urucum a 15 e 60 minutos, havendo pouca redução.

Palavras-chave: Células sésseis. Contaminação. Antimicrobianos.

ABSTRACT

In natural environments, microorganisms are commonly found in association with the surface and interface, forming cellular aggregates embedded in a polymer matrix that they produce, called biofilm. The biofilms are recalcitrant sources of contamination on surfaces in contact with food; however, the application of natural antimicrobials is considered an efficient alternative for the control. Our objective was to evaluate the potential for the formation of biofilm by the bacteria *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 on a polypropylene surface, when cultivated in TSB; to evaluate the bactericidal potential of the essential oils of *Curcuma longa* L. and *Bixa orellana* L. separately and combined, on the mature biofilm; and to evaluate morphologic aspects of the mature biofilm by scanning electronic microscopy, as well as the action of the essential oils on the bacteria. *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* were cultivated in TSB at 37 °C and submitted to the of biofilm formation process on the polypropylene surface. The adhered cells were treated with essential oils of turmeric, annatto and synergism at the concentration of 0.5%, under different contact times. There was satisfactory growth of both bacteria in the TSB, however, they were not capable of forming biofilm on the polypropylene surface. The essential oils completely inhibited the growth of *L. monocytogenes* on the polypropylene surface, while *P. aeruginosa* was shown resistant to the turmeric essential oil for 15 min. and annatto for 15 and 60 min. being little reduction.

Key words: Sessile cells. Contamination. Antimicrobials.

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da microbiologia os microrganismos têm sido caracterizados primariamente como planctônicos, descritos com base em suas características de crescimento, propriedades morfológicas e fisiológicas. No entanto, em ambientes naturais, microrganismos são comumente encontrados em associações com a superfície e interface, formando agregados celulares embebidos em uma matriz polimérica que eles mesmos produzem, denominado de biofilme (SINGH; PAUL; PAKESH, 2006).

O biofilme é constituído principalmente de água com aproximadamente 90 a 97%, microrganismos das mais variadas espécies, uma variedade de polissacarídeos extracelulares, enzimas, proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos, obtidos da lise celular (BROOKS; FLINT, 2008).

O processo de aderência e formação de biofilme é bastante complexo e envolve uma série de eventos sequenciais. O desenvolvimento de um biofilme *in vitro* é iniciado por células planctônicas que aderem reversivelmente em uma superfície condicionada por um filme, nessa etapa as células são susceptíveis a antimicrobianos e podem ser facilmente removidas; nas etapas subsequentes ocorre a adesão irreversível, com a multiplicação de células, formação de microcolônias e produção de uma matriz de exopolissacarídeo, formando um biofilme maduro (HOIBY et al., 2010).

A adesão e subsequente formação do biofilme podem ser influenciadas pela natureza da superfície celular, estrutura química e física da superfície de contato, disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e uma variedade de outros fatores (TAKHISTOV; GEORGE, 2004).

Na indústria de alimentos, biofilmes são considerados recalcitrantes fontes de contaminação, causando deterioração de alimentos e possível problema de saúde pública. Doenças de origem alimentar associadas a biofilme têm sido

relacionadas com a presença de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spp., *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Listeria monocytogenes e *Pseudomonas aeruginosa* têm sido associadas à formação de biofilme em diferentes superfícies de contato com alimento, como aço inoxidável, borracha, polipropileno, polietileno e outros. Na literatura há evidências de que bactérias no modo de crescimento séssil apresentam maior resistência a agentes externos e isso se deve em parte à expressão de diferentes genes, alteração na morfologia celular e produção de grandes quantidades de exopolissacarídeos (DRENKARD, 2003).

A resistência a antimicrobiano e práticas inadequadas de sanificação contribuem significativamente no processo de eliminação do biofilme. Contudo, a resistência bacteriana a antimicrobianos convencionais mostra que novas estratégias de controle do biofilme são necessárias (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

A aplicação de antimicrobianos naturais é considerada, nos dias atuais, como uma eficiente alternativa no controle de biofilme. Numerosos estudos têm mostrado o potencial antimicrobiano de óleos essenciais, no entanto pouca atenção tem sido dada a óleos essenciais de folhas de açafraão e urucum.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de formação de biofilme das bactérias *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em superfície de polipropileno, quando cultivadas em TSB; avaliar o potencial bactericida dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L., separadamente e combinados, no biofilme maduro; e, avaliar por microscopia eletrônica de varredura aspectos morfológicos do biofilme maduro, bem como a ação dos óleos essenciais sobre o mesmo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra Estrutural do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, onde foram realizadas análises microbiológicas e de microscopia eletrônica de varredura.

2.1 Microrganismos padrões

As bactérias utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Listeria monocytogenes* ATCC 19117. As culturas bacterianas foram padronizadas para aproximadamente 10^7 UFC/mL, utilizando-se curva padrão.

2.2 Higienização dos cupons

A adesão bacteriana foi realizada em cupons de polipropileno com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm.

Para higienização, os cupons foram imersos em solução comercial de ácido peracético 0,3% por 30 minutos, sob agitação de 50 rpm a 50 °C. Em seguida, foram rinsados por imersão em água destilada estéril à temperatura de 80 °C por 5 minutos e à temperatura ambiente por 1 minuto, sob agitação de 50 rpm. Os cupons foram secos em estufa de secagem a 40 °C por 2 horas e autoclavados por 15 min. a 115 °C (OULAHAL et al., 2008) com modificações.

2.3 Adesão das células bacterianas

Em duas placas de Petri de 140 mm de dimensão, contendo aproximadamente 40 cupons de polipropileno, foram imersos 60 mL de TSB e inoculados 10^7 UFC/mL de cada cultura. *Pseudomonas aeruginosa* e *L. monocytogenes* foram incubadas (monocultivo) a 37 °C, sob agitação branda (50 rpm). Na análise de biotransferência foi retirado 1 mL de TSB, em seguida foram realizadas diluições seriadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em UFC/mL.

Em intervalos de 48 horas, os cupons foram removidos, lavados com água peptonada e imersos em TSB estéril adicionado na placa. Esse procedimento foi realizado por cinco vezes, visando à formação completa do biofilme após dez dias de incubação (JOSEPH et al., 2001). Todo o experimento foi realizado em três repetições e as análises em duplicata.

2.4 Enumeração das células em biofilme

Para enumeração das células em biofilme, a cada dois dias de incubação, foi retirado um cupom de cada placa de Petri, o qual foi lavado com água peptonada, para a eliminação de células não aderidas, e, em seguida, as células em biofilme foram removidas utilizando-se *swab* estéril. Após esse procedimento, realizou-se a diluição seriada e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em

UFC/cm² (JOSEPH et al., 2001) com modificações. Todo o experimento foi realizado em três repetições e as análises em duplicata.

2.5 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a células sésseis

No teste de sensibilidade das células aderidas de *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* foram utilizados os óleos essenciais de folhas secas de *Curcuma longa* L. (Açafrão da Índia) e *Bixa orellana* L. (Urucum), isolados e em sinergismo, na concentração de 0,5%.

No décimo dia, foram retirados nove cupons de cada placa de Petri e submetidos ao processo de sanificação. Os cupons permaneceram em contato com as soluções durante 15, 30 e 60 minutos à temperatura ambiente.

Os cupons foram enxaguados em água peptonada. Na superfície sanificada do cupom realizou-se a técnica do esfregaço com *swab* estéril. Após esse procedimento, promoveu-se diluição seriada e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C por, aproximadamente, 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em UFC/cm².

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

No décimo dia os cupons, contendo biofilme e os sanificados, foram imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado), pelo período de 48 horas. Em seguida, os cupons foram lavados com tampão cacodilato e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, por 1 hora. Após este período foram lavados por três vezes em água destilada e desidratados em gradiente de etanol (25%, 50%, 70% e 90%, por 10 minutos; 99,9 por duas vezes de 10 minutos). O material foi

levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) para completar a secagem, montado em *stubs* e coberto com ouro (metalizador Bal-Tec SCD 050). Ao final desse procedimento foram obtidas eletromicrografias dos microrganismos aderidos à superfície de polipropileno, antes e após o uso de sanificantes, usando-se microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo (ALVES, 2004).

2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento em blocos casualizados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) em que empregou-se a análise de variância por meio do teste F, para verificar a diferença entre os tratamentos. Quando significativos, a comparação de médias para os materiais e dias foi realizada por meio do teste de Scott e Knott (1974).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento de bactérias em TSB e formação de biofilme em superfície de polipropileno

Nas condições propostas neste estudo, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* apresentaram modo de crescimento planctônico e modo de crescimento em biofilme, diferindo significativamente entre si.

O crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* quando cultivadas em TSB à temperatura de 37 °C foi satisfatório, comparado ao inóculo inicial de 10^7 UFC/mL. *Pseudomonas aeruginosa* obteve valor médio de crescimento em dez dias de cultivo de 9,25 Log UFC/mL, enquanto que *L. monocytogenes* foi de 8,79 Log UFC/mL. De acordo com a análise de variância por meio do teste F, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os dias de análise para *P. aeruginosa*. Em contrapartida, para *L. monocytogenes* não houve diferença ($p \leq 0,05$) (APÊNDICES C e D).

Nas primeiras 48 horas ambas as bactérias apresentaram crescimento limitado, aproximadamente 1 ciclo log, sendo que o crescimento máximo de *P. aeruginosa* deu-se no 6º dia (9,99 Log UFC/mL), enquanto que de *L. monocytogenes* foi no 8º dia (9,13 Log UFC/mL) (Gráfico 1). Vale ressaltar que, a partir do 4º dia, as células bacterianas presentes no meio de cultivo, modo de crescimento planctônico, foram provenientes dos cupons contendo biofilme, uma vez que houve adição de meio estéril a cada dois dias, processo este denominado de biotransferência.

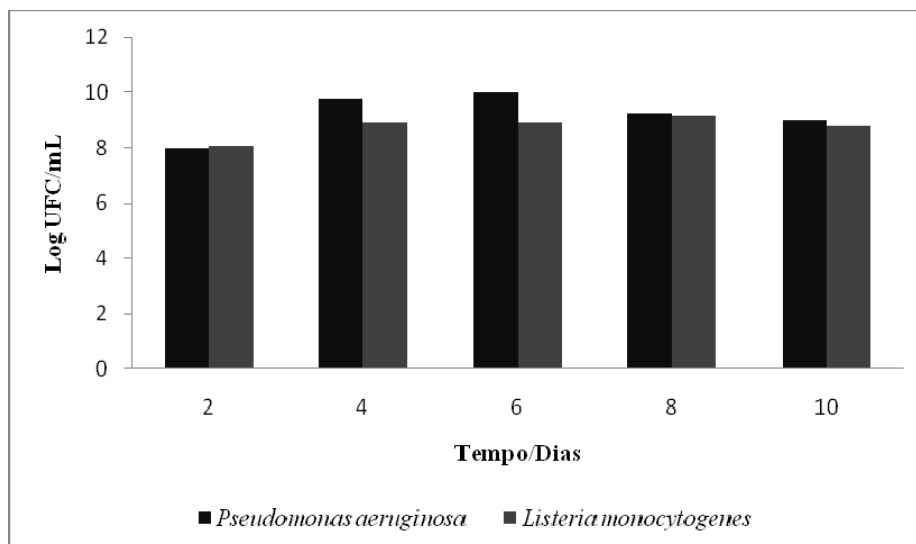


Gráfico1 Log do número médio de bactérias crescidas em TSB durante 10 dias de cultivo

Segundo Yates e Smotzer (2007) o crescimento microbiano é caracterizado pelo aumento do número de células, ou da massa microbiana, precedido por uma fase lag na qual as células promovem mudanças intracelulares para se adaptarem ao novo ambiente, podendo ou não ocorrer um pequeno crescimento. O crescimento microbiano é afetado pelas condições físicas e químicas do ambiente, sendo os principais fatores limitantes a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, tensão de oxigênio, dentre outros.

O crescimento de *L. monocytogenes* inferior ao de *Pseudomonas aeruginosa*, pode estar relacionado ao fato de que *P. aeruginosa* tem requerimentos nutricionais simples e é capaz de crescer rapidamente em meio de cultura sintético (LLOYD-JONES; LAURIE; TIZARD, 2005). Lungu, Ricke e Johnson (2009) citam ainda que *L. monocytogenes* apresenta diferentes

requerimentos nutricionais para o crescimento e é capaz de utilizar limitadas fontes de carboidratos para obtenção de energia, cujo elemento preferencial é a glicose. Phan-Thanh e Gormon (1997) mencionam que meios ricos nutricionalmente como TSB (*Trypticase soy broth*) e BHI (*Bovine brain heart infusion*) são ótimos para promoverem o crescimento de *Listeria* spp.

A temperatura de 37 °C também foi favorável para o crescimento, uma vez que *Pseudomonas aeruginosa* apresenta crescimento em temperatura na faixa de 4 a 42 °C e *Listeria monocytogenes* cresce em temperatura que varia de 0 a 45 °C (LUNGU; RICKE; JOHNSON, 2009).

A transição de célula planctônica para biofilme é regulada por uma série de fatores fisiológicos e ambientais, tais como: densidade celular, disponibilidade de nutrientes e estresse celular (LANDINI et al., 2010).

Pseudomonas aeruginosa e *Listeria monocytogenes* foram capazes de formar biofilme na superfície de polipropileno, quando cultivadas em TSB à temperatura de 37 °C, considerando que para se formar biofilme são necessárias, no mínimo, 10⁵ células aderidas por cm² (RONNER; WONG, 1993). Pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância, pode-se inferir que houve maior contagem de células no estado planctônico do que aderidas à superfície de polipropileno, para ambas as bactérias.

A capacidade de formação de biofilme em dez dias de cultivo foi de 6,46 Log UFC/cm² para *P. aeruginosa* e de 6,06 Log UFC/cm² para *L. monocytogenes*. De acordo com o teste Scott-Knott, ao nível de 5% de significância houve diferença significativa entre os dias de análise para *P. aeruginosa*, enquanto que para *L. monocytogenes* não houve diferença significativa.

O Gráfico 2 representa os valores médios do crescimento de *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* na superfície de polipropileno, durante dez dias.

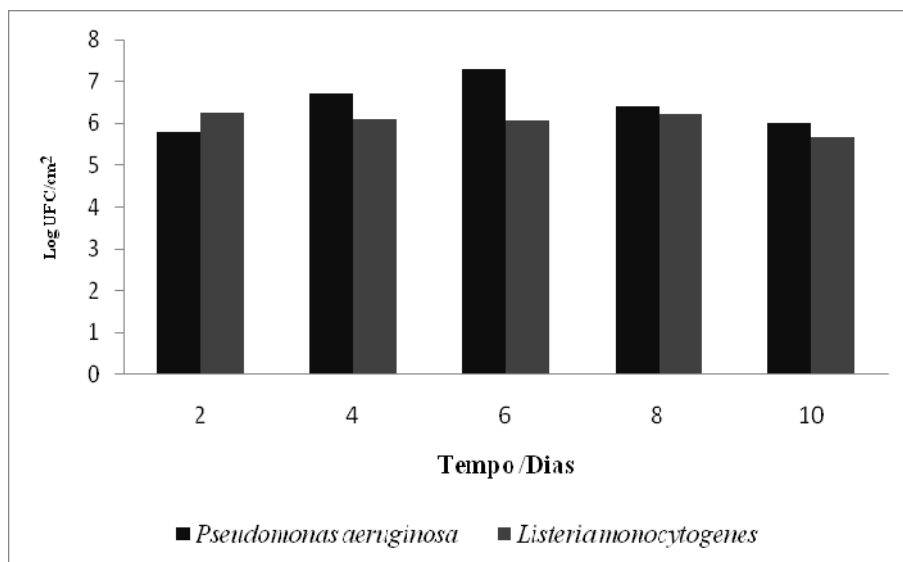


Gráfico 2 Log do número médio de bactérias crescidas na superfície de polipropileno, durante 10 dias

Hoiby et al. (2010) citam que *P. aeruginosa* produz um biofilme maduro *in vitro* de 5 a 7 dias, fato observado também neste estudo, no qual ocorreu maior crescimento na superfície de polipropileno no 6º dia (7,29 Log UFC/mL). Por outro lado, *L. monocytogenes* apresentou maior capacidade de formação de biofilme, 6,26 Log UFC/mL, nas primeiras 48 horas.

Segundo Bower, McGuire e Daeschel (1996) o tempo necessário para a formação completa do biofilme varia de acordo com a linhagem estudada, enquanto que o processo de adesão inicial pode ocorrer dentro de minutos a poucas horas, dependendo do meio de cultivo, da bactéria e da superfície, ocorrendo mais rapidamente em superfícies que apresentam maior rugosidade e cobertas com filme condicionante.

Segundo Gjermansen et al. (2010) a formação e desenvolvimento do biofilme são afetados pela hidrofobicidade celular e pela presença de

componentes extracelulares, tais como: adesinas, apêndices proteináceos e exopolissacarídeos; interação envolvendo a comunicação intracelular; velocidade do fluxo; concentração de nutrientes; pH, temperatura, característica da superfície de contato e outros. Cerca et al. (2005) relatam que a formação do biofilme é mais dependente da interação entre as células do que da quantidade de células inicialmente aderidas à superfície.

As características físicas (topografia) e químicas (carga elétrica da superfície, hidrofobicidade e energia livre) da superfície, bem como características da célula, representam importante papel no processo de adesão.

De acordo com Ploux et al. (2007) bactérias com parede celular hidrofóbica preferem substratos hidrofóbicos, enquanto que aquelas com parede celular hidrofílica preferem substratos hidrofílicos. Liu et al. (2004) incluem que quando a superfície da célula e do substrato são hidrofóbicas, a adesão microbiana é altamente facilitada; se ambas as superfícies são hidrofílicas, a adesão microbiana pode ser realizada com dificuldade; aumentando a hidrofobicidade da superfície celular pode-se favorecer a adesão em superfície hidrofílica.

Embora não tenha sido realizado teste de hidrofobicidade da superfície de polipropileno, Lugão et al. (2007) caracterizam a superfície de polipropileno como hidrofóbica, dessa maneira pode-se inferir que a maior capacidade de formação de biofilme de *P. aeruginosa* deve-se à propriedade hidrofóbica da parede celular.

A hidrofobicidade de *L. monocytogenes* é influenciada diretamente pela temperatura, pois a 37 °C muitas linhagens não produzem flagelo e são imóveis, devido à repressão do gene flagelar *Mog*, sendo sua síntese a 30 °C ou inferior (LEMON; HIGGINS; KOLTER, 2007). Ainda que a presença do flagelo influencie na hidrofobicidade da célula, sua principal função é promover a

locomoção. Nota-se que a motilidade flagelar tem mostrado ser de grande importância para formação do biofilme.

Para *Pseudomonas aeruginosa* o flagelo desempenha ainda importante papel de adesão nos estágios iniciais do desenvolvimento do biofilme, enquanto que a formação de microcolônias está condicionada à motilidade *twisting* (motilidade de contração), que é dependente do pili tipo IV (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

Parizzi et al. (2004) investigaram a capacidade de adesão de *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável, policarbonato e polipropileno a 30 °C. Os resultados mostraram que ambas as bactérias apresentaram maior aderência na superfície de polipropileno, quando cultivadas por 10 horas.

Segundo Whitehead e Verran (2006) superfícies que apresentam ranhuras ou fendas de proporções similares ao tamanho da célula, propiciam maior retenção do microrganismo, do que superfícies rugosas ou lisas. O valor recomendado para a rugosidade de superfície de contato com alimento é de 0,8 µm ou menos (HILBERT et al., 2003).

A rugosidade da superfície de polipropileno não foi analisada, mas como pode ser visualizado na Figura 1, apresenta-se bastante irregular, com ranhuras e fendas. Nota-se que tais características não influenciaram diretamente para formação do biofilme.

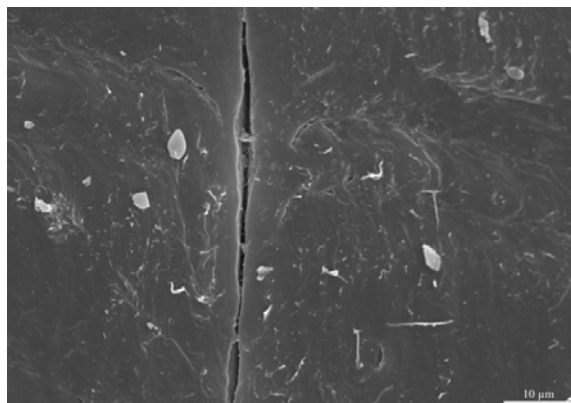


Figura 1 Característica da superfície de polipropileno observada através de eletromicrografia de varredura.

Resultados de estudo realizado por Oh et al. (2009) mostraram que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 formou biofilme nas superfícies de aço, alumínio, borracha e polipropileno a 25 °C. Os resultados indicaram que o polipropileno apresentou maior rugosidade quando comparado às demais superfícies e tais autores mencionam que a maior formação de biofilme em polipropileno pode estar relacionada à tal característica.

Dentre os vários fatores que interferem na formação do biofilme a concentração dos nutrientes tem relevante importância. Segundo Mai e Conner (2007) a influência dos nutrientes está diretamente relacionada à espécie.

Carpentier e Chassaing (2004) mencionam que *Listeria monocytogenes*, quando cultivada em meios TSB e BHI, não apresentam alto potencial para formar biofilme e usualmente não formam microcolônias em superfícies de contato com alimento, tais como aço inoxidável.

Harvey, Keenan e Gilmour (2007) analisaram a formação de biofilme em poliestireno a 20 °C, por 12 linhagens de *L. monocytogenes* em TSB, 1/15 de TSB e Welshime's modificado (MWB). Os resultados mostraram que a

formação do biofilme por todas as linhagens aumentou com o aumento do tempo de incubação, 24, 48 e 72 horas, a 20 °C em TSB, em contrapartida o período de incubação acima de 48 horas não aumentou a formação do biofilme, quando cultivadas em 1/15 de TSB e MWB. Desconsiderando o tempo de incubação, a maior quantidade de biofilme foi observada em MWB, seguido de TSB e 1/15 de TSB.

A adesão a superfície e formação de biofilme proporcionam vantagens aos microrganismos como maior capacidade de retenção de nutrição, proteção contra procedimentos de sanificação e vantagens adaptativas. Atualmente, a aplicação de antimicrobianos naturais tem atraído a atenção de pesquisadores de diversas áreas, pois apresenta amplo espectro de ação e causa menos impacto no ambiente.

3.2 Aplicação de óleos essenciais no controle de biofilme

Pseudomonas aeruginosa e *Listeria monocytogenes*, quando em biofilme na superfície de polipropileno, foram expostas aos óleos essenciais de açafraão, urucum e o sinergismo na concentração de 0,5% em diferentes tempos, à temperatura ambiente. De acordo com a análise de variância, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tempos analisados e entre os óleos essenciais, para ambas as bactérias (APÊNDICE E).

As células viáveis de *L. monocytogenes* em biofilme na superfície de polipropileno, quando tratadas com os óleos essenciais, foram reduzidas por completo. Os óleos essenciais de açafraão e sinergismo foram capazes de danificar a parede celular de *L. monocytogenes*, enquanto que poros podem ser observados ao longo de toda a estrutura celular quando exposta ao óleo essencial de urucum (Figura 2). Pode-se observar ainda nas Figuras 2B e 2C a presença de resíduos de exopolissacarídeo.

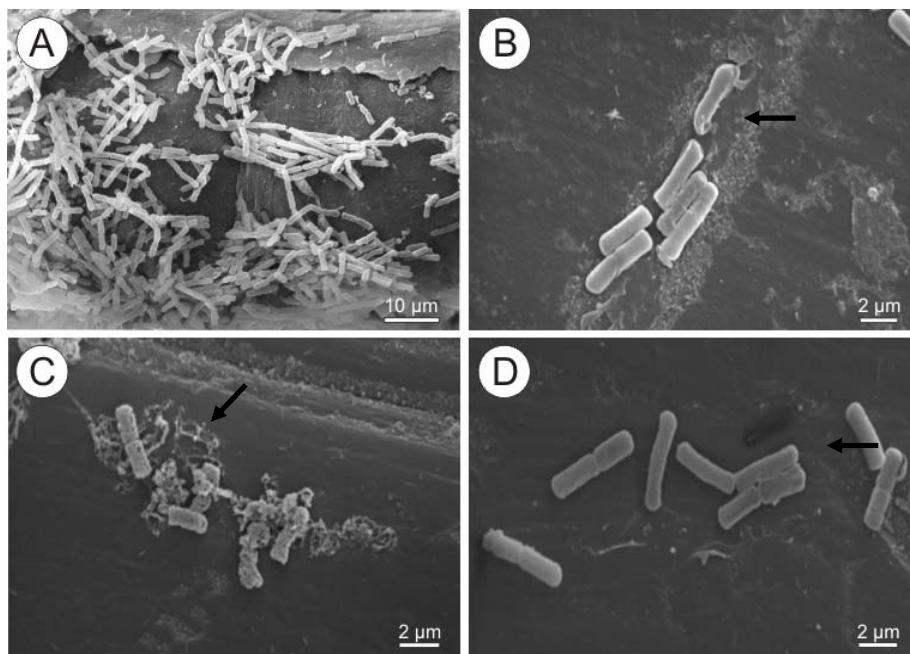


Figura 2 Micrografia eletrônica de varredura de células de *L. monocytogenes* aderidas em superfície de polipropileno (A) e tratadas com óleos essenciais de açafrão (B), urucum (C) e sinergismo (D)

Em contrapartida, *P. aeruginosa* em biofilme, quando exposta aos óleos essenciais de açafrão por 15 minutos e urucum a 15 e 60 minutos, reduziram somente, 2,11; 2,62 e 2,26 ciclos Log, respectivamente. Nos demais tempos de exposição e na combinação houve danos irreversíveis nas células (Figura 3).

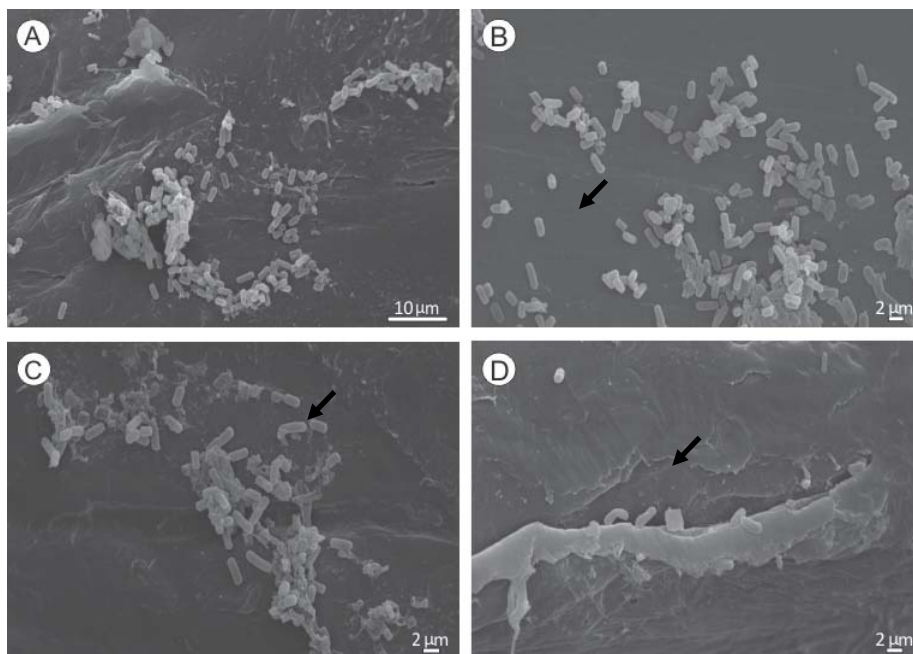


Figura 3 Micrografia eletrônica de varredura de células de *P. aeruginosa* aderidas em superfície de polipropileno (A) e tratadas com óleos essenciais de açafrão (B), urucum (C) e sinergismo (D)

Segundo Bakkli et al. (2008) devido à grande quantidade de constituintes químicos dos óleos essenciais, não existe um alvo específico. No entanto, alguns autores sugerem que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está atribuída aos compostos majoritários.

Os compostos majoritários identificados no óleo essencial de açafrão foram o α -felandreno (41,07%) e terpinoleno (27,38%), seguidos do 1,8-cineol (7,70%), β -pineno (4,79%) e limoneno (3,04%), enquanto que de urucum foram o α -humuleno (43,01%), E-nerolidol (14,40%) e espatulenol (7,57%).

Como típico lipofílico, ele passa através da parede celular e membrana citoplasmática, rompe as estruturas das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípídeos e permeabiliza (BAKKLI et al., 2008). De acordo

com Burt (2004) bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação dos óleos essenciais do que bactérias Gram-positivas devido à membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas, que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos. Tal fato foi observado neste estudo para a ação do óleo essencial de açafraão e urucum sobre *P. aeruginosa*.

Na literatura há ausência de relatos sobre a aplicação de óleos essenciais de folhas secas de açafraão e urucum no controle de biofilme formado por bactérias patogênicas, no entanto existem algumas referências pautadas sobre a aplicação de diferentes óleos em relação ao biofilme de *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*.

Estudo realizado por Oliveira et al. (2010) revelaram que soluções desinfetantes baseadas em óleos essenciais de folhas frescas de *Cymbopogon nardus* e *Cymbopogon citratus* e combinação foram eficientes na remoção de biofilme formado por *Listeria monocytogenes* em superfície de aço inoxidável quando cultivada em TSB a 37 °C.

Sandasi, Leonard e Viljoe (2008) investigaram o efeito de cinco componentes comuns de óleos essenciais (α -pineno, 1,8-cineol, +-limoneno, linalol e acetato de geranyl) contra biofilmes de *L. monocytogenes*. Os resultados mostraram que nenhum dos componentes selecionados exibiu atividade antilisterial durante seis horas de contato com o biofilme, em contrapartida aumentaram-no. A atividade metabólica do biofilme foi reduzida apenas depois de seis horas de incubação e então permaneceu constante.

Vale ressaltar, que a aplicação da microscopia eletrônica de varredura no presente estudo foi uma ferramenta adicional na análise das células aderidas, bem como na análise do efeito dos óleos essenciais sobre as células.

An e Friedman (1997) citam que dentre as várias técnicas para avaliar a adesão microbiana em superfícies, a microscopia eletrônica de varredura é um

método que proporciona observar a morfologia da célula e do material da superfície, bem como a interação entre eles.

Técnicas laboratoriais convencionais associadas a técnicas de microscopias são na atualidade ótimas ferramentas no estudo de células aderidas em superfície de contato com alimento.

4 CONCLUSÃO

Pseudomonas aeruginosa e *Listeria monocytogenes* apresentaram ótimo crescimento planctônico e no modo sésil, quando incubadas a 37 °C.

Os óleos essenciais de açafão, urucum e sinergismo a 0,5%, causaram danos irreversíveis na estrutura celular de *L. monocytogenes* quando aderidas na superfície de polipropileno. Por outro lado, *P. aeruginosa* apresentou maior resistência aos óleos essenciais de açafão e urucum quando exposta em diferentes tempos de contato.

A técnica de microscopia eletrônica de varredura contribuiu para o estudo da formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* na superfície de polipropileno, bem como do efeito dos óleos essenciais na estrutura celular.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 54 p.

AN, Y. H.; FRIEDMAN, R. J. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 141-152, Aug. 1997.

BAKKLI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 152-156, May 1996.

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 2163-2176, Dec. 2008.

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.

CARPENTIER, B.; CHASSAING, D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 111-122, Dec. 2004.

CERCA, N. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 506-514, May 2005.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 13, p. 1213-1219, Nov. 2003.

GJERMANSEN, M. et al. Characterization of starvation: induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 75, n. 4, p. 815-826, May 2010.

HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 4, p. 380-392, June 2007.

HILBERT, L. R. et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Birmingham, v. 52, n. 3, p. 173-185, Oct. 2003.

HOIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bethesda, v. 35, n. 4, p. 322-332, 2010.

JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 367-372, Mar. 2001.

LANDINI, P. et al. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 86, n. 3, p. 813-823, Feb. 2010.

LEMON, K. P.; HIGGINS, D. E.; KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 12, p. 4418-4424, Dec. 2007.

LIU, Y. et al. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. **Journal of Biotechnology**, Washington, v. 110, n. 3, p. 251-256, June 2004.

LLOYD-JONES, G.; LAURIE, A. D.; TIZARD, A. C. Quantification of the *Pseudomonas* population in New Zealand soils by fluorogenic PCR assay and culturing techniques. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 217-224, Feb. 2005.

LUGÃO, A. B. et al. Review on the production process and uses of controlled rheology polypropylene-gamma radiation versus electron beam processing. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 76, n. 12, p. 1688-1690, Dec. 2007.

LUNGU, B.; RICKE, S. C.; JOHNSON, M. G. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. **Anaerobe**, London, v. 15, n. 1/2, p. 7-17, Feb./Apr. 2009.

MAI, T. L.; CONNER, D. E. Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 282-286, Dec. 2007.

OH, Y. J. et al. Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. **Ultramicroscopy**, Amsterdam, v. 109, n. 8, p. 874-880, July 2009.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

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

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 178-185, Feb. 2008.

PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 77-83, Mar. 2004.

PHAN-THANH, L.; GORMON, T. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 91-95, Mar. 1997.

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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 14 ago. 2010.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Thyphimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 9, p. 750-758, Sept. 1993.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOE, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 11, p. 1070-1075, Nov. 2008.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SIMÕES, M.; SIMÕES, M. L.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 43, n. 4, p. 573-583, May 2010.

SINGH, R.; PAUL, D.; PAKESH, K. J. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 9, p. 389-397, Sept. 2006.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilms. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 351-359, 2004.

WHITEHEAD, K. A.; VERRAN, J. The effect to surface topography on the retention of microorganisms. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 84, n. 4, p. 253-259, Apr. 2006.

YATES, G. T.; SMOTZER, T. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 244, n. 3, p. 511-517, Feb. 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A Análise de variância para formação de halo sobre *P. aeruginosa* em função dos óleos de açafrão, urucum e sinergismo em seis concentrações diferentes

	GL	SQ	QM	F	P-valor	
Óleo	2	242.62	121.31	14.79	0.000	*
Concentração	5	238.75	47.75	5.82	0.001	*
Repetição	2	19.56	9.78	1.19	0.316	
Óleo X Concentração	10	349.21	34.92	4.26	0.001	*
Resíduos	34	278.94	8.20			

APÊNDICE B Análise de variância para formação de halo sobre *L. monocytogenes* em função dos óleos de açafrão, urucum e sinergismo em seis concentrações diferentes

FV	GL	SQ	QM	F	P-valor	
Óleo	2	0.84	0.42	0.93	0.403	
Concentração	5	48.41	9.68	21.48	0.000	***
Repetição	2	1.01	0.50	1.12	0.338	
Óleo X Concentração	10	5.05	0.50	1.12	0.377	
Resíduos	34	15.32	0.45			

APÊNDICE C Análise de variância para Log (UFC) de *P. aeruginosa* segundo os tratamentos estudados

	GL	SQ	QM	F	P-valor
Local	1	107.10	107.10	210.12	< 0.001
Dias	4	16.973	4.243	8.3251	< 0.001
Bloco	1	1.01	1.013	1.9869	0.1657
Local X Dias	4	2.20	0.55	1.0796	0.3782
Resíduos	44	22.43	0.51		

APÊNDICE D Análise de variância para Log (UFC) de *L. monocytogenes* segundo os tratamentos estudados

	GL	SQ	QM	F	P-valor
Local	1	101.984	101.984	217.3986	<0.001
Dias	4	1.692	0.423	0.9019	0.4711
Bloco	1	0.137	0.137	0.2922	0.5915
Local X Dias	4	2.611	0.653	1.3913	0.2526
Resíduos	44	20.641	0.469		

APÊNDICE E Análise de variância para redução de *P. aeruginosa* segundo os tratamentos estudados com a transformação Box-Cox.

	GL	SQ	QM	F	P-valor
Óleo	2	0.0	0.0	1.0	0.35936
Tempo	2	0.02	0.012	1.048	0.3594
Bloco	1	0.037	0.037	3.143	0.0832
Óleo X Tempo	4	0.025	0.006	0.524	0.7187
Resíduos	44	0.519	0.012		