



**TENILLE RIBEIRO DE SOUZA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE  
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE  
*Staphylococcus aureus***

**LAVRAS - MG**

**2015**

**TENILLE RIBEIRO DE SOUZA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS  
E SÉSSEIS DE *Staphylococcus aureus***

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS - MG**

**2015**

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

Souza, Tenille Ribeiro de.

Óleos essenciais no controle de células planctônicas e sésseis de  
*Staphylococcus aureus* / Tenille Ribeiro de Souza. – Lavras : UFLA,  
2015.

70 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Bactéria patogênica. 2. Biofilme. 3. Sanificantes naturais. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**TENILLE RIBEIRO DE SOUZA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS  
E SÉSSEIS DE *Staphylococcus aureus***

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dra. Patrícia Gomes Cardoso UFLA

Dra. Maíra Maciel Mattos de Oliveira IFES

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2015**

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Rita e Enio Carlos e ao meu irmão  
Enio Jr.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus primeiramente por iluminar meus caminhos, dar-me forças, perseverança e inteligência para que eu pudesse alcançar mais esta vitória.

À minha orientadora, Roberta, pela paciência, conhecimentos transmitidos e orientação, desde a graduação, sempre disposta a ajudar, muito obrigada pela confiança e amizade.

Aos meus pais, Maria Rita e Enio Carlos, pelo incentivo, amor, compreensão e por serem meu porto seguro.

A meu irmão Enio Jr pelo apoio e, mesmo de longe, sempre esteve presente em minha vida.

Ao meu noivo Alvaro, por estar comigo em todos os momentos, compartilhando alegrias e tristezas e que me mostrou o verdadeiro amor e felicidade.

À minha cunhada Mayara pelo carinho.

À Letícia pela convivência, amizade, conversas intermináveis e risadas no laboratório; sua ajuda foi fundamental na realização deste trabalho.

A todos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA (UFLA), Aline Martins, Nayane, Victor, Eliane, Heloísa, Luara, Alline Souza, Bruna e Silas e a todos meus colegas do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela convivência e conhecimentos compartilhados.

À Gabi e a Fer pela amizade, sempre tornando meu dia mais feliz.

À Ana Clara, Débora, Viviane e Naina pelo companheirismo e amizade.

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

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

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, muito obrigada.

## RESUMO GERAL

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, patogênica, presente nos alimentos, capaz de produzir enterotoxinas, sendo frequentemente envolvida em surtos alimentares. Forma biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, sendo estas fonte constante de contaminação, precisando ser controlados. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Syzygium aromaticum* sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *Staphylococcus aureus* 8702, bem como avaliar a ação da combinação destes OEs sobre o biofilme formado por estas duas cepas em aço inoxidável AISI 304, tendo como substrato leite desnatado UHT. Para avaliar a atividade antimicrobiana dos OEs, determinaram-se CMI (concentração mínima inibitória) e a CMB (concentração mínima bactericida) dos OEs testados sobre células planctônicas e determinou-se a CMB<sub>B</sub> (concentração mínima bactericida sobre o biofilme). As duas cepas de *S. aureus* apresentaram resistências diferentes aos OE testados, sendo a cepa ATCC 8702 mais resistente aos OE do que a ATCC 5674. Dentre os OEs avaliados, foram selecionados os OEs de *C. cassia*, *C. camphora*, *L. cubeba*, para avaliação antimicrobiana sobre células sésseis. Esses OEs foram selecionados com base nas menores CMB, *C. cassia* de 0,3125%, *C. camphora* de 1,25% e *L. cubeba* de 0,63% sobre ATCC 5674, e esses OEs também tiveram as concentrações mais baixas sobre ATCC 8702, exceto para o OE de *C. camphora* (CMB de 5%). Quando os OEs de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* foram testados sobre células sésseis de *S. aureus*, as duas cepas avaliadas apresentaram comportamento diferente, sendo ATCC 5674 quando em biofilme se mostrou mais resistente aos OEs testados do que quando em estado planctônico. Soluções sanificantes com base na combinação dos OE *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* foram avaliadas sobre biofilme formado pela ATCC 5674 e ATCC 8702 em leite desnatado UAT após 72h de incubação. Também foi testada uma solução sanificante com base na combinação dos OE de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* em combinação com detergente enzimático. As soluções sanificantes com base nos OEs avaliados foram capazes de reduzir 2,5 log UFC/cm<sup>2</sup> em ambas as estirpes testadas, obtendo resultados significativos (p<0,05) em relação ao controle. A solução sanificante contendo os OEs e o detergente enzimático não teve diferença significativa dos outros tratamentos. A combinação destes OE apresentou resultados promissores para serem utilizados como sanificantes nas indústrias de alimentos.

Palavras chave: Bactéria patogênica. Biofilme. Sanificantes naturais.

## GENERAL ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a Gram positive bacteria, pathogenic in foods, capable of producing enterotoxins and are often involved in food outbreaks. Biofilms form on biotic and abiotic surfaces, which are constant source of contamination and need to be controlled. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils (EOs) of *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Syzygium aromaticum* on planktonic cells and sessile of *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 and *Staphylococcus aureus* 8702 and to evaluate the effect of the combination of these EOs on the biofilm formed by these two strains of stainless steel AISI 304, with the substrate UHT skimmed milk. To evaluate the antimicrobial activity of the EOs, determined to MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) of EOs tested on planktonic cells and determined the MBC<sub>b</sub> (minimum bactericidal concentration on the biofilm). The two strains of *S. aureus* showed different resistances tested EO, with the ATCC 8702 strain more resistant than the EOATCC 5674. Among the evaluated EOs, the EOs of *C. cassia* were selected, *C. camphora*, *L. cubeba* for antimicrobial evaluation of sessile cells. These EOs were selected based on lowest MBC, 0.3125% of *C. cassia*, *C. camphora* 1.25% and 0.63% of *L. cubeba* about ATCC 5674, and these EOs also had the lowest concentrations of ATCC 8702, except for EO *C. camphora* (MBC 5%). When EOs *C. cassia*, *L. cubeb* *C. camphor* and sessile cells were tested against *S. aureus*, the two strains showed different behavior evaluated, and when biofilm ATCC 5674 was more resistant than EOs when tested planktonic state. Sanitizing solutions based on the combination of EOs *C. cassia*, *L. cubeb* and *C. camphora* were evaluated for biofilm formed by ATCC 5674 and ATCC 8702 in UHT skimmed milk after 72h of incubation. Also tested was one sanitizing solution based on a combination of EOs *C. cassia*, *L. cubeba* and *C. camphor* in combination with enzymatic detergent. The sanitizing solutions based on the evaluated were able to reduce EOs 2.5 log CFU / cm<sup>2</sup> on both strains tested, obtaining significant results (p <0.05) compared to control. The sanitizing solution containing the EOs and the enzymatic detergent was not significantly different from other treatments. The combination of the EO showed promising results as sanitizers for use in the food industries.

Key words: Pathogenic bacteria. Biofilm. Natural sanitizers.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução Geral .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Biofilmes microbianos: Uma visão geral</b> .....	15
<b>2.2.1</b>	<b>Etapas envolvidas na formação de biofilmes microbianos</b> .....	16
<b>2.2.2</b>	<b>Biofilmes na indústria de alimentos</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Processo de higienização na indústria de alimentos</b> .....	20
<b>2.4</b>	<b>Resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos</b> .....	22
<b>2.5</b>	<b>Óleos Essenciais</b> .....	23
<b>2.5.1</b>	<b>Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais</b> .....	25
<b>2.5.2</b>	<b>Diversidade de óleos essenciais</b> .....	28
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>CAPÍTULO 2</b> Óleos essenciais no controle de células planctônicas e sésseis de duas cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
<b>2.1</b>	<b>Óleos essenciais e detergente enzimático</b> .....	43
<b>2.2</b>	<b>Caracterização química dos óleos essenciais</b> .....	43
<b>2.3</b>	<b>Micro-organismos padrão e culturas estoque</b> .....	44
<b>2.4</b>	<b>Padronização e preparo dos inóculos</b> .....	45
<b>2.5</b>	<b>Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínimas bactericidas (CMB) de óleos essenciais sobre células planctônicas</b> .....	45
<b>2.6</b>	<b>Determinação da Concentração Mínima Bactericida de óleos essenciais sobre biofilmes (CMB<sub>B</sub>)</b> .....	46
<b>2.7</b>	<b>Estudo do sinergismo entre os óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis</b> .....	47
<b>2.8</b>	<b>Ação antimicrobiana de soluções de óleos essenciais sobre biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> formados sobre aço inoxidável</b> .....	49
<b>2.8.1</b>	<b>Higienização dos cupons</b> .....	49
<b>2.8.2</b>	<b>Formação de biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	50
<b>2.8.3</b>	<b>Tratamento dos biofilmes com as soluções de óleos essenciais e detergentes sanificantes</b> .....	50
<b>2.9</b>	<b>Análise estatística</b> .....	52
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53

3.1	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5674 e <i>S. aureus</i> ATCC 8702 .....	53
4	CONCLUSÕES .....	64
	REFERÊNCIAS .....	65
	ANEXO.....	69

## CAPITULO 1 Introdução Geral

### 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, patogênica, capaz de causar toxi-infecção alimentar. É largamente distribuída na natureza, estando presente no gado leiteiro apresentando altos números de micro-organismos no leite (MACHOSHVILI; PENNA; COLOMBO, 1991). *S. aureus* é capaz de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas.

Biofilmes são comunidades de micro-organismos embebidos em matriz polimérica extracelular e aderidos a uma superfície sólida (LAWRENCE; KORBER; HOYLE, 1991). Esse tipo de organização é extremamente vantajosa a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, disseminação de bacteriófagos e resistência a antimicrobianos (GILBERT; MCBAIN; RICKARD, 2003). Sendo assim, em estrutura de biofilme, as bactérias apresentam aumento de sua resistência a agentes adversos quando comparadas a células planctônicas, dificultando a ação dos sanificantes químicos, sendo o biofilme representando fonte constante de contaminação de alimentos, com consequentes perdas econômicas e veiculação de toxi-infecções alimentares. Entretanto, os sanificantes químicos ainda são os mais utilizados pelas indústrias alimentícias, ocorrendo, muitas vezes, ineficiência no controle de biofilmes.

Recentemente, a atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre biofilmes vem sendo avaliada, visando à possível utilização desses compostos como agentes sanificantes na indústria de alimentos. Óleos essenciais são formados com base em vias metabólicas secundárias das plantas, são compostos tipicamente lipofílicos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento da

permeabilidade por danificar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos (BAKKALI et al., 2008). Os metabólitos secundários apresentam diversas atividades biológicas e possuem potencial para serem utilizados na produção de fármacos, cosméticos, inseticidas, fungicidas e bactericidas. Os principais metabólitos secundários encontrados com atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA et al., 2008). Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais, sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *Staphylococcus aureus* ATCC 8702 bem como avaliar a ação da combinação desses óleos sobre biofilme formado por essas duas cepas em aço inoxidável AISI 304, tendo como substrato leite desnatado UAT.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

A espécie mais importante do gênero *Staphylococcus* é a *Staphylococcus aureus* (BHUNIA, 2008). Eles são habitantes naturais de humanos e animais, muitas vezes, afetando vários organismos.

*Staphylococcus aureus* pertence à família Staphylococcaceae, é um cocos gram-positivo (1 µm de diâmetro) que aparece microscopicamente como “cachos de uva”. Eles são imóveis e produzem colônias amarelas douradas. *Staphylococcus aureus*, é um micro-organismo catalase positiva, aeróbio facultativo e cresce abundantemente sob condições aeróbicas. Em condições aeróbicas, produz acetoina como o produto final do metabolismo da glicose. Ele fermenta manitol, faz coagulação do plasma de coelho, produz termonuclearese é sensível para lisostafina. *S. aureus* é tolerante ao sal (10-15%) e relativamente resistente à secagem e calor (BHUNIA, 2008).

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes etiológicos da mastite bovina. A mastite estafilocócica é bem conhecida pelos rebanhos leiteiros, e as chances de contrair intoxicação alimentar são grandes se o leite infectado dessas vacas contaminadas com mastite for consumido ou utilizado na fabricação de queijos dentre outros produtos derivados do leite. Há poucas dúvidas de que diversas linhagens causadoras de mastite bovina são provenientes de humanos. Intoxicação alimentar estafilocócica é uma das mais comuns doenças transmitidas por alimentos no mundo inteiro (JAY, 2005).

As diversas espécies de *Staphylococcus* destacam-se pela capacidade de se tornarem resistentes a grande número de drogas antibacterianas. Isso acontece em razão do uso frequente e indiscriminado de drogas antibacterianas e, também, aos mecanismos de transferência de resistência entre os

microrganismos (FERREIRA et al., 2006). Este fato é comumente observado no campo em surtos de mastite (BRITO et al., 2001).

*Staphylococcus aureus* forma biofilme fortemente sobre superfícies bióticas e abióticas como o aço inoxidável (BOARI et al., 2009; MILLEZI, 2012). Quando presente em biofilme, *S. aureus* fica ainda mais resistente e difícil de ser eliminado.

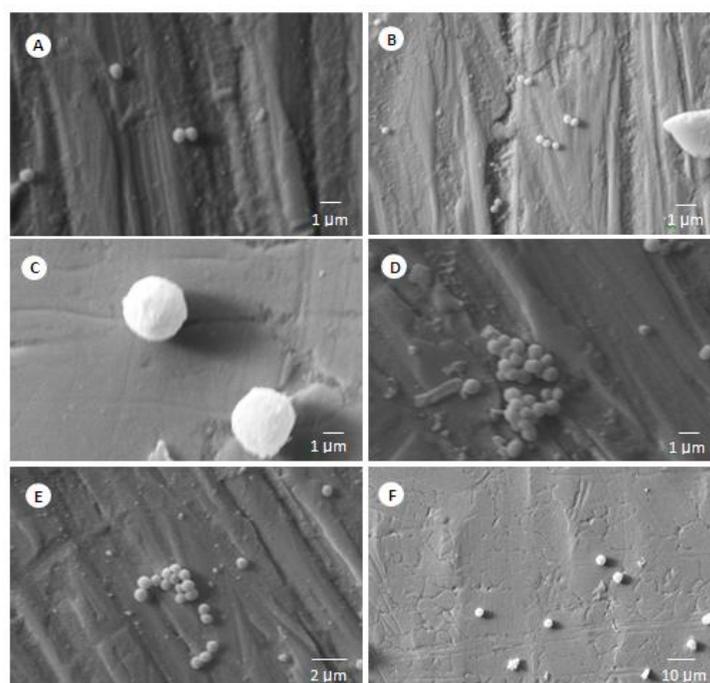


Figura1 Eletromicrografias de varredura de células sésseis de *Staphylococcus aureus* formado sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) à 37°C

Nota: (A, B, C, F) Bactérias isoladas. (D, E) Bactérias agregadas.

A figura 1 mostra imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formação de biofilme por *S. aureus* nos cupons de aço inoxidável depois de um período de incubação de 4 dias a 37°C, algumas bactérias isoladas e colônias.

## 2.2 Biofilmes microbianos: Uma visão geral

Os biofilmes podem ser definidos como comunidades complexas de micro-organismos, envolvidos por uma matriz extracelular de exopolissacarídeos (EPS) (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007), e estes podem estar aderidos em superfícies bióticas ou abióticas (DUNNE JUNIOR, 2002; LASA; PENADÉS, 2005). Esse termo biofilme surgiu pra descrever a forma de vida sésil dos micro-organismos. Os biofilmes podem ser encontrados em qualquer parte onde haja água e um suporte sólido para se desenvolverem (TORTORA; FUNKE; CASE, 2010). Cerca de 95 a 99% dos micro-organismos podem alterar seu estado de vida, sendo em biofilme ou em células planctônicas (livres no meio) (LYNCH; ROBERTSON, 2008) No seu estado sésil, as células possuem maior capacidade de proteção e sobrevivência às adversidades do ambiente, comparadas quando estão no seu estado planctônico. Este tipo de organização é extremamente vantajoso a todas as espécies de micro-organismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e resistência a antimicrobianos. Isso ocorre em virtude de vários fatores, dentre eles a formação da camada de exopolissacarídeos e também pelo estado de homeostase que os biofilmes se encontram, produzindo assim um ambiente dinâmico, organizado de maneira a utilizar todos os nutrientes disponíveis (GILBERT; MCBAIN; RICKARD, 2003; SUTHERLAND, 2001).

Os biofilmes podem ser formados por apenas uma espécie, sendo, no caso, denominados monoespécie ou por mais de uma espécie de micro-organismos, os chamados multiespécies, que são os mais comumente encontrados na natureza. Segundo Dunne Júnior (2002), quando um biofilme é composto de espécies heterogêneas, os subprodutos metabólicos de um organismo poderiam servir de suporte para o crescimento de outro, enquanto a

adesão de uma espécie poderia fornecer ligantes que permitem a adesão de outros.

A composição dos biofilmes é dependente das condições do meio em que se encontram, como temperatura, substâncias envolvidas, pressão, pH e oxigênio dissolvido, não sendo necessariamente uniforme, podendo abranger partículas sólidas inorgânicas, como argilas e areias, bem como partículas orgânicas provenientes do substrato aquoso onde está imerso (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; WIMPENNY; KINNIMENT; SCOURFIELD, 1993).

A composição geralmente encontrada em biofilme está representada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição da matriz do biofilme

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

Fonte: Surtheland (2001)

### 2.2.1 Etapas envolvidas na formação de biofilmes microbianos

A formação de biofilme se inicia quando os micro-organismos, em estado planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir em alguma superfície. Alguns fatores são possíveis de estimular esse processo como pH,

concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores do *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura (OULAHAL et al., 2008). Estes eventos iniciais são a chave de todo o processo de formação de biofilme (JOHNSON, 2007), sendo o *quórum sensing* um sistema de comunicação entre os micro-organismos, favorecendo assim a formação do biofilme.

O desenvolvimento de um biofilme é um processo complexo e inclui várias etapas, cujo número difere conforme o autor, entretanto há um consenso que existem as fases reversível e irreversível (Figura 2).

A adesão reversível acontece pela fraca interação entre o micro-organismo e a superfície, em um substrato. Essa interação envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas. Durante o estágio reversível, bactérias são facilmente removidas (WATNICK; KOLTER, 2000). A adesão é considerada reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico (DAVIES et al., 1998; SAUER et al., 2002).

A adesão irreversível resulta da fixação de apêndices celulares como pilus, flagelos, fímbrias, proteínas adesinas e substâncias poliméricas extracelulares (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013; SUTHERLAND, 1997), portanto a morfologia das células exerce fundamental importância no processo de ancoragem e aderência das células à superfície (PRAKASH; VEEGOWDA; KRISHNAPPA, 2003; TRACHOO, 2003). Essa adesão faz com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990), envolvendo interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações covalentes e iônicas.

Estudos mostram que a adesão irreversível pode ocorrer em poucas horas de interação entre substrato e superfície (HOOD; ZOTTOLA, 1995; SMOOT; PIERSON, 1998). A remoção de células aderidas irreversivelmente é

difícil e requer aplicação de forte força física ou interrupção química pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanificantes ou calor (SINDE; CARBALLO, 2000).

Após a formação do biofilme, ocorre a multiplicação das bactérias, formando assim microcolônias envoltas pela matriz exopolissacarídeo (EPS) (MALONE; CALDWELL, 1983).

O aumento da população em um biofilme acontece tanto pela divisão celular, quanto pela redistribuição de células entre as microcolônias e pela adesão de novas células planctônicas – co-agregação (STOODLEY et al., 2002). Os microrganismos aderidos são capazes de estimular a adesão de células planctônicas (BOS; MEI; BUSSCHER, 1999).

O biofilme maduro é constituído por significativo aumento da densidade populacional, produção e adsorção das substâncias presentes na matriz de EPS, possibilitando o aumento em sua espessura (CHENG et al., 2007). Dentre os fatores que determinam a maturação do biofilme, destacam-se a disponibilidade e transporte de nutrientes, difusão de oxigênio, osmolaridade, pH interno e excreção de substâncias tóxicas às células (CARPENTIER; CERF, 1993; TOOLE; KOLTER, 1998). Após a fase de amadurecimento, as células sésseis são destacadas e, em seu estado planctônico, podem colonizar outras superfícies e causar novas contaminações (CLONTS, 2008).

O desprendimento das células em biofilme, seu desenvolvimento e maturação são resultados da densidade populacional e modulação da expressão gênica, que é controlado por moléculas sinalizadoras (*quorum sensing*) (CHOPP et al., 2002).

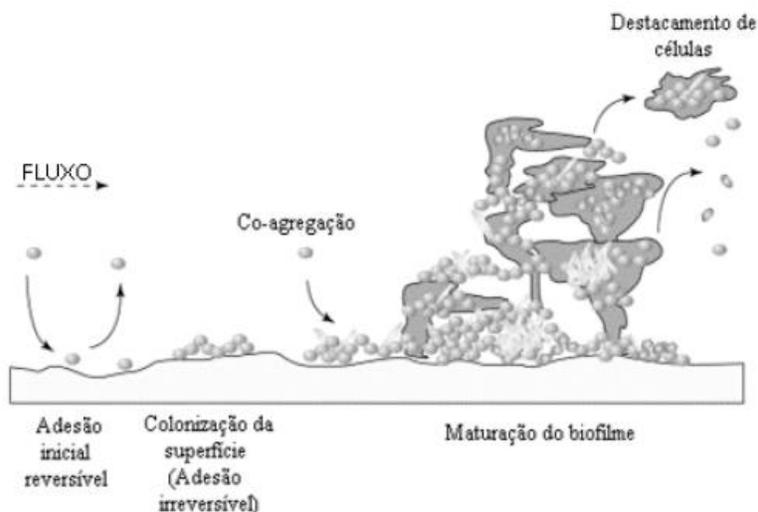


Figura 2 Ciclo de desenvolvimento dos biofilmes

Fonte: Adaptado de Jenkinson e Lappin-Scott (2001).

### 2.2.2 Biofilmes na indústria de alimentos

Em ambientes de processamento de alimentos, a formação de biofilmes eleva o risco de contaminação microbiana do produto processado e causa deterioração dos alimentos.

Biofilmes, na sua fase final de formação, podem se desprender a partir da superfície, sendo preocupação constante na indústria de alimentos. Eles podem aderir em utensílios e equipamentos usados no processamento de alimentos, abrigando micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes, sendo assim fonte constante de contaminação, colocando em risco a vida do consumidor (MEYER, 2003). Com isso a indústria de alimentos deve adotar medidas de prevenção, para que as bactérias não formem biofilmes, ou utilizar um controle capaz de eliminá-los.

Os materiais utilizados no processamento na indústria de alimentos, na maioria das vezes, são de aço inoxidável, sendo o polipropileno também muito

utilizado. O aço inoxidável é considerado ideal para o processamento, é de fácil limpeza, fisiologicamente estável em diversas temperaturas e possui alta resistência à corrosão, entretanto apresenta alto custo (PENG; TSAI; CHOU, 2001). Em razão disso, o estudo das possibilidades de contaminação cruzada de alimentos, determinando a taxa de adesão bacteriana e a formação de biofilmes nesse tipo de material torna-se muito importante (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

É considerável que a superfície e o meio aonde o micro-organismo se encontra influencia diretamente na sua adesão. O leite é um excelente substrato para o desenvolvimento de micro-organismo, sendo rico em nutrientes, proteínas, vitaminas e matéria orgânica, possui alta atividade de água e pH próximo à neutralidade, tornando a indústria de laticínios um importante foco na formação de biofilmes.

A contaminação de alimentos começa no “campo” como vindo da água de irrigação contaminada, fezes de animais, quando aplicado como fertilizante ou de pastar de animais domésticos ou selvagens no pomar, esterco não tratado, sementes contaminadas, insetos vetores, os manipuladores de alimentos. Na maioria das vezes, os micro-organismos presentes nesse tipo de contaminação como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp, *E.coli* são os mesmos que vão causar problemas na indústria de alimentos, sendo esses micro-organismos capazes de formar biofilme (BHUNIA, 2008; SILVA JÚNIOR, 2007).

### **2.3 Processo de higienização na indústria de alimentos**

A higienização feita nas indústrias de alimentos, buscando controlar os micro-organismos indesejáveis, nem sempre são efetivas e realizadas de maneira correta, podendo assim levar a contaminações por inadequada remoção dos

microrganismos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos (BOS; MEI; BUSSCHER, 2000).

Nas indústrias de alimentos, a higienização é dividida em duas etapas muito bem definidas: limpeza e sanificação. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais os quais apresentam dificuldades distintas de remoção (Tabela 2). A sanificação, por sua vez, tem como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de deteriorantes em níveis considerados seguros. A limpeza reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios, por isso a sanificação é indispensável (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

A limpeza é responsável pela remoção de até 99,9% das partículas indesejáveis; o restante 0,01% inclui os microrganismos capazes de deteriorar os alimentos ou causar toxinfecções alimentares aos indivíduos que os ingerem (FUJIHARA; SYLVIO, 2003).

Tabela 2 Substâncias presentes nos alimentos e sua dificuldade de remoção na etapa de limpeza

COMPOSIÇÃO	SOLUBILIDADE	FACILIDADE DE REMOÇÃO	AÇÃO DO CALOR
Açúcar	Hidrossolúvel	Fácil	Caramelização; Aumenta dificuldade
Gordura	Insolúvel em água; solúvel em álcalis	Difícil	Polimerização, maior dificuldade.
Proteína	Insolúvel em água; solúvel em álcali e ácidos	Muito difícil	Desnaturação; muito maior dificuldade.
Sais minerais	Variável	Variável	Afeta pouco

A sanificação complementa o procedimento de higienização, assegurando a qualidade microbiológica das superfícies (ANDRADE, MACÊDO 1996). Trata-se de um procedimento que elimina ou reduz os microrganismos patogênicos até níveis suportáveis sem risco à saúde (SILVA JÚNIOR, 2007). A redução do número de microrganismos, quando se utilizam sanificantes químicos, depende, entre outras coisas, das propriedades biocidas do agente, da concentração, da temperatura e do pH, bem como do grau de contato entre o sanificante e os microrganismos, que pode ser conseguido por agitação, turbulência (uso de ultrassom) e baixa tensão superficial. Ressalta-se que os vários microrganismos apresentam resistência diferente aos sanificantes químicos (OLIVEIRA et al., 2006).

#### **2.4 Resistência dos biofilmes a agentes antimicrobianos**

A primeira observação da inerente resistência de infecções por biofilme à terapia por antibióticos ocorreu na década de 70, em virtude do surgimento de bactérias muito diferentes e muito alarmantes, que eram resistentes aos mesmos agentes, em decorrência de adaptações metabólicas. A maioria dos antimicrobianos utilizados, sanificantes, dentre outros agentes químicos teve sua eficácia testada em células planctônicas o que difere sua ação em células sésseis (COSTERTON, 2007).

As células planctônicas, quando comparadas aos biofilmes, são mais susceptíveis à ação de agentes estressantes como sanificantes químicos, antibióticos e vários outros agentes antimicrobianos. Essa resistência do biofilme pode ser explicada pelas células sésseis expressarem genes que diferem daquelas planctônicas, apresentando assim propriedades fenotípicas e bioquímicas diferentes e também pela própria estrutura do biofilme (COSTERTON, 2007; PRIGENT-COMBARET; LEJEUNE, 1999).

Um das mais importantes descobertas sobre biofilmes é o fato de que várias bactérias transferem entre si diversas características genéticas: a resistência a produtos antibióticos, por exemplo, é transferida a outras células da comunidade por meio de plasmídeos. 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 (TENOVER, 2006; TENOVER; WEIGEL; APPELBAUM, 2004).

As células em biofilmes estão embebidas em uma matriz polimérica (EPS) (MEYER, 2003), que dificulta a difusão de agentes antimicrobianos.

## **2.5 Óleos Essenciais**

Os óleos essenciais são formados com base em vias metabólicas secundárias das plantas e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIMÕES; SPITZER, 2004). Nas células vegetais, o metabolismo pode ser dividido em primário e secundário (SIMÕES et al., 2007). O metabolismo primário é responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais das plantas. Contudo os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos conhecidos como metabólitos secundários. Os metabólitos secundários apresentam diversas atividades biológicas, possuem potencial para serem utilizados na produção de

fármacos, cosméticos, inseticidas, fungicidas e bactericidas. Os principais metabólitos secundários, encontrados com atividade biológica, são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA et al., 2008).

As plantas apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies. O conjunto de compostos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante seu crescimento, sendo esse equilíbrio influenciado por fatores genéticos e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo e água, os quais são variáveis. Eles são comumente concentrados em uma região em particular da planta e, quando ocorrem em várias partes destas, possuem diferentes perfis de composição (OUSSALAH et al., 2007).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados; porém, todos eles originam-se do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato, conforme demonstrado na Figura 3. Quando em mistura, os compostos apresentam-se em diferentes concentrações, porém, geralmente um, dois ou três deles são encontrados em proporções maiores, sendo denominados de compostos majoritários. Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos voláteis pertencem de forma quase exclusiva a duas séries, caracterizadas por suas origens biossintéticas distintas: a série terpênica e a série, muito menos frequente, dos fenilpropanoides (BANDONI; CZEPAK, 2008; CARDOSO et al., 2001).

Biologicamente, os óleos essenciais, por serem voláteis, atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Essa característica torna as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, sendo largamente estudadas na agricultura por

apresentarem atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas (SAITO; SCRAMIN, 2000).

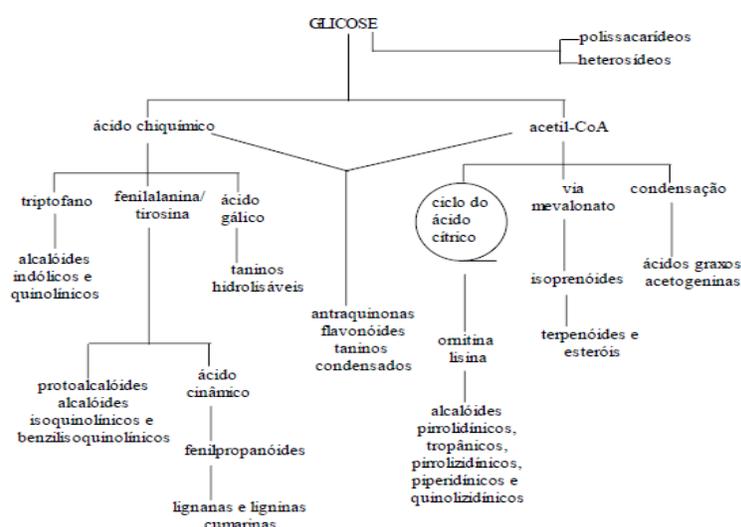


Figura 3 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: Santos (2004).

São conhecidos 3.000 óleos essenciais, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêutica, agrônômica, de alimentos, de cosméticos e de perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

### 2.5.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Dentre as várias utilidades dos óleos essenciais, sua capacidade antimicrobiana tem sido uma das mais estudadas. Seu modo de ação nos diferentes micro-organismos está associado aos seus componentes.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas diz respeito, principalmente, a danos estruturais e funcionais à membrana

citoplasmática (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1994). Uma importante característica dos óleos essenciais é a lipofilicidade, o que permite que os óleos passem por meio da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, quebrando-os e, assim, alterando a permeabilidade dessas organelas (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; LAMBERT et al., 2001).

Em virtude da grande variedade de moléculas presentes em extratos naturais, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais não pode ser atribuída a um único mecanismo. Em vez disso, diferentes mecanismos bioquímicos e estruturais estão envolvidos em locais múltiplos no interior e na superfície da célula (BURT, 2004). Estes mecanismos incluem modificações químicas na membrana celular, citoplasma, enzimas e proteínas e podem alterar completamente a conformação da célula microbiana. Além disso, a perda sustentada de “iões” ou metabólitos em decorrência da exposição a um óxido de etileno pode comprometer o metabolismo microbiano e conduzir à morte da célula (CARSON; MEE; RILEY, 2002; NAZZARO et al., 2013). A figura 4 descreve alguns potenciais mecanismos de ação dos óleos essenciais e / ou seus componentes, e mostra os potenciais alvos celulares da sua atividade antimicrobiana. No entanto, cada uma dessas ações não pode ser considerada eventos separados, mas em vez disso pode ser uma consequência das outras atividades (NAZZARO et al., 2013).

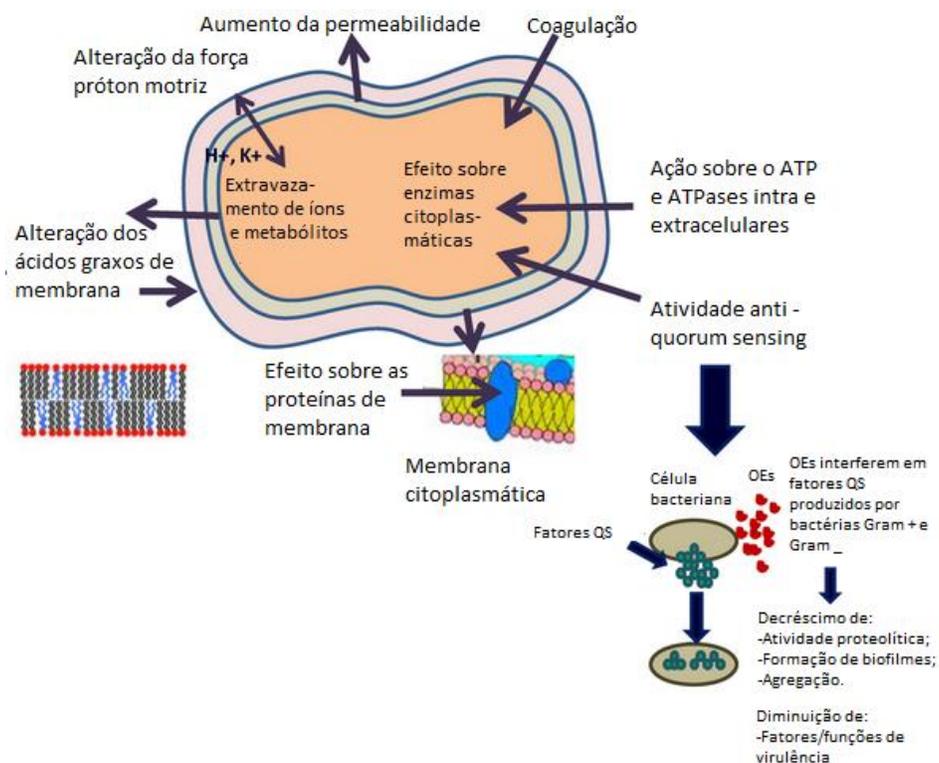


Figura 4 Mecanismo de ação dos óleos essenciais (OEs) na célula microbiana  
Fonte: Nazzaro et al. (2013)

Segundo Conner e Beuchat (1984), os óleos essenciais danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive aqueles envolvidos na produção de energia celular na síntese de compostos estruturais. A presença de óleos essenciais interfere também no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular.

A atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre biofilmes vem sendo avaliada, visando à possível utilização desses compostos como agentes sanitizantes na indústria de alimentos. Oussalah et al. (2007) avaliaram o efeito de diversos óleos essenciais nas concentrações de 0.003; 0.006; 0.013; 0.025; 0.05, 0.1, 0.2, 0.4% sobre *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* e observaram efeito antibacteriano para os óleos

essenciais de *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *Origanum heracleoticum*, *Satureja montana* e *Cinnamomum verum*, o qual foi atribuído aos compostos majoritários carvacrol, aldeído cinâmico e ao timol.

### 2.5.2 Diversidade de óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversos vegetais de diferentes famílias. Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (SIMÕES et al., 2007).

A canforeira tem diversas variedades, as quais têm óleos essenciais com diferentes composições químicas. A variedade Ho-wood (*Cinnamomum camphora* Nees e Eberm var. *linaloolifera* Fujita) possui alto conteúdo de linalol (FRIZZO et al., 1999). Seu óleo essencial é obtido das folhas, industrialmente ou não e tem importância econômica em razão dos seus principais componentes, cânfora e linalol (GUENTER, 1976). A espécie *Cinnamomum cassia* é uma planta aromática e medicinal pertencente à família Lauraceae cujo óleo essencial obtido da casca contém aldeído cinâmico (55%), seguido do eugenol (12%), enquanto nas folhas encontraram-se o eugenol (94%), como composto majoritário, e traços de aldeído cinâmico (1%) (KOKETSU et al., 1997). Já o

óleo essencial de *Litsea cubeba*, também pertencente à família Lauraceae, rico em citral.

*Origanum vulgare* (orégano) é uma planta aromática, condimentar pertencente à família Lamiaceae. A atividade antimicrobiana do orégano é atribuída aos seus óleos essenciais que contêm terpenos como o carvacrol e timol, o  $\gamma$ -terpineno e o p-cimeno são precursores do timol e carvacrol, respectivamente, portanto, sua concentração no produto é proporcional aos teores de seus precursores (BURT, 2004; SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). *Thymus vulgaris* L. é uma planta aromática e condimentar que assim como o orégano pertence à família Lamiaceae, e é conhecida no Brasil como tomilho (SILVA JÚNIOR; VERONA, 1997). O óleo essencial do tomilho é rico em timol e carvacrol e o timol e carvacrol são isômeros (BAKKALI et al., 2008; SHAN, 2002).

*Rosmarinus officinalis* o alecrim, da família Lamiaceae e seus óleos essenciais são constituídos de 16-20% borneol, 27-30% cineol, 10% cânfora, 2-7% acetato de bornil (FARREL, 1995). Pereira (2006) comprovou a atividade antifúngica do óleo essencial de cinco plantas condimentares: *Rosmarium officinales* (alecrim), *Allium cepa* (cebola), *Ocimum basilum* (manjeriço), *Mentha piprita* (menta) e *Origanum vulgare* (orégano). Esses foram estudados sobre os fungos do gênero *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp, apresentando como concentração inibitória de 1500  $\mu\text{g/mL}$ .

*Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) pertence à família Myrtaceae, sendo seu óleo essencial obtido dos botões florais dessecados, o qual contém mais de 85%, por volume, de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70% a 95%), acetato de eugenila e  $\beta$ -cariofileno (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Diferentes métodos de extração são usados para isolar óleos essenciais de plantas aromáticas, tais como a hidrodestilação, a destilação a vapor, a

extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico, dentre outros.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 95 p.

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

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Spring Science Business, 2008. 276 p. (Food Science Text Series).

BOARI, C.A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BOS, R.; MEI, C. van der; BUSSCHER, H.J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions: its mechanisms and methods for study. **FEMS Microbiology Reviews**, Haren, v.23, n. 2, p.179-229, Apr. 1999.

BRITO, M. A. V. P. et al. Minimum inhibitory concentrations for ten antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 2001, n. 5, p. 531-537, Oct. 2001.

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

CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais**: visão geral, química e medicinal. Lavras: UFLA, 2001. v. 1, 81 p. (Textos Acadêmicos).

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

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

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic. **Biomaterials**, Surrey, v.28, n. 29, p.4192-4199, Oct. 2007.

CHOPP, D.L. et al. A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 29, n. 6, p. 339-346, Dec. 2002.

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

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

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 49, p.429-434, 1984.

COSTERTON, J. W. Resistance of biofilms to antibacterial agents. In: \_\_\_\_\_. **The biofilm primer**. New York: Springer, 2007. p.56-61.

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.

DUNNE JUNIOR, W. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n.2, p.155-166, 2002.

FARREL, T. K. **Spices, condiments, and seasonings**. 3<sup>rd</sup>ed. New York: V.N.Reinhold, 1995. 414 p.

FERREIRA, L. M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1228-1234, 2006.

FRIZZO, C. D. et al. Essential oils of camphor tree (*Cinnamomum camphora* Ness & Eberm) cultivated in southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 3, p. 313-316, 1999.

FUENTE-NÚÑES, C. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.16, n. 5, p.580-589, Oct. 2013.

FUJIHARA, R. M.; SYLVIO, S. B. Limpeza e desinfecção de plantas de processamento. In: CONTRERAS, C. C. et al. (Ed.). **Higiene e sanitização na indústria de carne e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. p. 7-16.

GILBERT, P.; MCBAIN, A.J.; RICKARD, A.H. Formation of microbial biofilme in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 51, n. 4, p. 245-248, June 2003.

GUENTHER, E. **The essential oil**. Davis: Krieger, 1976. 507p.

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

JAY, M. J. Gastreenterite estafilocócica. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.471-485.

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

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. 2007.

KOKETSU, M. et al. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, set./dez. 1997.

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

LASA, I.; PENADÉS, J. R. BapA: a large protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Molecular Microbiology**, Salem, v.58, p.1322-1339, 2005.

LAWRENCE, J. R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n.20, p. 6558-6567, Oct. 1991.

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

MACHOSHVILI, I.A.; PENNA, T.C.V.; COLOMBO, A.J. Resistência térmicas de cepas de *Staphylococcus aureus* em solução tampão fosfato (pH 7,0) e em leite reconstituído. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 22, n. 4, p. 323-329, 1991.

MALONE, J. A.; CALDWELL, D. E. Evaluation of surface colonization kinetics in continuous culture. **Microbial Ecology**, Oslo, v.9, p.299-305, 1983.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v.51, n. 4, p.249-253, June 2003.

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

NAZZARO, F. et al. Review effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, p. 1451-1474, Nov. 2013.

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

OLIVEIRA, L. A. T. et al. Biofilme na indústria de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 141, p. 33-35, 2006.

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

OUSSALAH, M.et al. Antimicrobial effects of alginate-based films containing essential oils on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* present in bologna and ham. **Journal of Food Protection**, Guildford, v.70, n. 4, p.901-908. Apr. 2007.

PENG, J. S.; TSAI, W.C.; CHOU, C.C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.65, n. 1/2, p.105-111, Apr. 2001.

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

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, 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.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current Science**, Columbus, v.85, n.9, p.1299-1307, 2003.

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

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. 3. ed. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. 48 p. (Documentos, 20).

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta a medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 403-434.

SAUER, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.184, n. 4, p.1140-1154, Feb. 2002.

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

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

SILVA JUNIOR, A. A. S.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas.** 2. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente/Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997. 456 p.

SILVA JÚNIOR, E. **Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação.** 6. ed. São Paulo: Varela, 2007. 267 p.

SIMÕES, C. M.; SPITZEER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 403-434.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, London, v. 17, n.4, p.439-447, Aug. 2000.

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

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, Jan. 2002.

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

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

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 119, n. 6, p. 3-S10, June 2006.

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

TOOLE, G.O.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent, signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 28, n. 3, p. 449-461, Apr. 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1024 p.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, Songkhla, v.25, n.6, p. 807-815, 2003.

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

WIMPENNY, J. W. T.; KINNIMENT, S. L.; SCOURFIELD, M. A. The physiology and biochemistry of biofilm. In: \_\_\_\_\_. **Microbial biofilms: formation and control**. Oxford: Blackwell Scientific, 1993. p.51-94.

## CAPÍTULO 2 Óleos essenciais no controle de células planctônicas e sésseis de duas cepas de *Staphylococcus aureus*

### RESUMO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, patogênica, presente nos alimentos, capaz de produzir enterotoxinas, sendo frequentemente envolvida em surtos alimentares. Forma biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, sendo estas fonte constante de contaminação, precisando ser controlados. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (OEs) de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Syzygium aromaticum* sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *Staphylococcus aureus* 8702, bem como avaliar a ação da combinação destes OEs sobre o biofilme formado por estas duas cepas em aço inoxidável AISI 304, tendo como substrato leite desnatado UHT. Para avaliar a atividade antimicrobiana dos OEs, determinaram-se CMI (concentração mínima inibitória) e a CMB (concentração mínima bactericida) dos OEs testados sobre células planctônicas e determinou-se a CMB<sub>B</sub> (concentração mínima bactericida sobre o biofilme). As duas cepas de *S. aureus* apresentaram resistências diferentes aos OE testados, sendo a cepa ATCC 8702 mais resistente aos OE do que a ATCC 5674. Dentre os OEs avaliados, foram selecionados os OEs de *C. cassia*, *C. camphora*, *L. cubeba*, para avaliação antimicrobiana sobre células sésseis. Esses OEs foram selecionados com base nas menores CMB, *C. cassia* de 0,3125%, *C. camphora* de 1,25% e *L. cubeba* de 0,63% sobre ATCC 5674, e esses OEs também tiveram as concentrações mais baixas sobre ATCC 8702, exceto para o OE de *C. camphora* (CMB de 5%). Soluções sanificantes com base na combinação dos OE *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* foram avaliadas sobre biofilme formado pela ATCC 5674 e ATCC 8702 em leite desnatado UAT após 72h de incubação. Também foi testada uma solução sanificante com base na combinação dos OE de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* em combinação com detergente enzimático. As soluções sanificantes com base nos OEs avaliados foram capazes de reduzir 2,5 log UFC/cm<sup>2</sup> em ambas as estirpes testadas, obtendo resultados significativos (p<0,05) em relação ao controle. A solução sanificante contendo os OEs e o detergente enzimático não teve diferença significativa dos outros tratamentos. A combinação destes OE apresentou resultados promissores para serem utilizados como sanificantes nas indústrias de alimentos.

Palavras chave: Bactéria patogênica. Biofilme. Sanificantes naturais.

## GENERAL ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* is a Gram positive bacteria, pathogenic in foods, capable of producing enterotoxins and are often involved in food outbreaks. Biofilms form on biotic and abiotic surfaces, which are constant source of contamination and need to be controlled. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils (EOs) of *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* and *Syzygium aromaticum* on planktonic cells and sessile of *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 and *Staphylococcus aureus* 8702 and to evaluate the effect of the combination of these EOs on the biofilm formed by these two strains of stainless steel AISI 304, with the substrate UHT skimmed milk. To evaluate the antimicrobial activity of the EOs, determined to MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) of EOs tested on planktonic cells and determined the MBCb (minimum bactericidal concentration on the biofilm). The two strains of *S. aureus* showed different resistances tested EO, with the ATCC 8702 strain more resistant than the EO ATCC 5674. Among the evaluated EOs, the EOs of *C. cassia* were selected, *C. camphora*, *L. cubeba* for antimicrobial evaluation of sessile cells. These EOs were selected based on lowest MBC, 0.3125% of *C. cassia*, *C. camphora* 1.25% and 0.63% of *L. cubeba* about ATCC 5674, and these EOs also had the lowest concentrations of ATCC 8702, except for EO *C. camphora* (MBC 5%). Sanitizing solutions based on the combination of EOs *C. cassia*, *L. cubeba* and *C. camphora* were evaluated for biofilm formed by ATCC 5674 and ATCC 8702 in UHT skimmed milk after 72h of incubation. Also tested was one sanitizing solution based on a combination of EOs *C. cassia*, *L. cubeba* and *C. camphora* in combination with enzymatic detergent. The sanitizing solutions based on the evaluated were able to reduce EOs 2.5 log CFU / cm<sup>2</sup> on both strains tested, obtaining significant results (p <0.05) compared to control. The sanitizing solution containing the EOs and the enzymatic detergent was not significantly different from other treatments. The combination of the EO showed promising results as sanitizers for use in the food industries.

Key words: Pathogenic bacteria. Biofilm. Natural sanitizers.

## 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogênica encontrada comumente nos seres humanos, responsável por surtos de toxi-infecções alimentares no mundo todo em virtude da ingestão de alimentos contendo toxinas estafilocócicas. Além disso, é um notório patógeno capaz de causar infecções crônicas e agudas no homem e nos animais (BHUNIA, 2008).

Além de causar toxinose pela ingestão de alimentos, contendo toxinas estafilocócicas, é também um dos agentes etiológicos da mastite bovina. A mastite estafilocócica é bem conhecida pelos rebanhos leiteiros, as chances de contrair intoxicação alimentar são grandes se o leite infectado dessas vacas contaminadas com mastite for consumido ou utilizado na fabricação de queijos dentre outros produtos derivados do leite (BHUNIA, 2008; JAY, 2007).

*Staphylococcus aureus* é capaz de aderir em superfícies e formar biofilmes sendo estes difíceis de remover. As células, quando organizadas em biofilmes, apresentam maior resistência aos agentes antimicrobianos comparados às células planctônicas. Os biofilmes são definidos como agregados de micro-organismos embebidos por matriz polimérica e aderidos à superfície sólida, formando estrutura porosa e altamente hidratada, contendo exopolissacarídeos e pequenos canais abertos por entre as microcolônias (LAWRENCE et al., 1991). Estes apresentam propriedades tanto fenotípicas como genotípicas diferentes das células livres no meio (PRIGENT-COMBARET; LEJEUNE, 1999). Atualmente, a resistência de bactérias a produtos antimicrobianos tanto na indústria de alimentos como na área agrícola tem aumentado, dificultando o controle microbiológico.

As superfícies, em contato direto com os alimentos, devem ser atóxicas, não absorventes, não porosas ou corrosivas. Dos vários materiais utilizados na

indústria alimentar, o melhor para as superfícies que entram em contato direto com os alimentos é o aço inoxidável.

Acompanhando as tendências naturais do mercado consumidor, o uso de novos antimicrobianos naturais no controle de bactérias patogênicas, tem sido enfatizado como possível alternativa na indústria alimentícia. Os óleos essenciais possuem atividade tanto bactericida como fungicida (LANCIOTTI et al., 2004) e, em baixas concentrações, são considerados seguros, mostrando sua importância e sua elevada ação antimicrobiana. Eles são formados com base no metabolismo secundário das plantas e têm chamado a atenção de pesquisadores de várias áreas, pois possuem características antioxidantes, antimicrobianas, flavorizantes, aromáticas, antisépticas, carminativas, antiespasmódicas e expectorantes, tendo um crescimento no mercado. Recentes trabalhos evidenciam a capacidade dos óleos essenciais de atuarem sobre biofilmes (OLIVEIRA et al., 2012).

Neste contexto, objetivou desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais, sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702 bem como avaliar a ação da combinação desses óleos sobre biofilme formado por essas duas cepas em aço inoxidável AISI 304, tendo como substrato leite desnatado UAT.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

### **2.1 Óleos essenciais e detergente enzimático**

Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Syzygium aromaticum* foram adquiridos da FERQUIMA Indústria e comércio Ltda e o detergente enzimático utilizado foi ENZIMAVIC DT4, componentes ativos: Amilase, Lípases, Protease e Carbohidrase adquirido na VIC PHARMA Indústria e Comércio Ltda.

### **2.2 Caracterização química dos óleos essenciais**

A tabela 1 mostra a caracterização química dos óleos essenciais utilizados, obtidos por análise cromatográfica CG-EM e CG-DIC, realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA.

Tabela 1 Constituintes químicos de diferentes óleos essenciais identificados por CG-EM e CG-DIC

Óleo essencial	Compostos majoritários (%)	Total (%)
<i>Cinnamomum cassia</i> (canela)	E-cinamaldeído (84,52), (E)-o-Metoxi-cinamaldeído (8,79), Acetato de E-cinamila (1,44), Cumarina (1,01); Benzaldeído (0,88).	96,64
<i>Cinnamomum camphora</i>	Mirceno (0,32), Limoneno (0,13), 1,8-cineol (0,11), E-ocimeno (0,19), Linalol (98,11), Canfora (0,15).	99,01
<i>Litsea cubeba</i> (pimenta chinesa)	Citral (40,5), Neral (31,33), Limone (13,21), $\alpha$ -pineno (1,34), Sabineno (1,28)	86,66
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	Carvacrol (73,11), $\beta$ -cariofilene (4,32), $\gamma$ -terpineno (3,93), p-cimeno (3,92), Timol (2,97).	88,25
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alegrim)	1,8-Cineol (48,47), Pínenos: ( $\alpha$ ) (14,71); ( $\beta$ ) (7,00), Canfora (14,03), Canfeno (3,41), Borneol (1,30).	88,92
<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	Timol (50,89), $\sigma$ -cimeno (24,97), $\gamma$ -terpineno (5,91), Linalol (4,46) Carvacrol (2,93).	89,16

### 2.3 Micro-organismos padrão e culturas estoque

As bactérias utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *Staphylococcus aureus* ATCC 8702, pertencentes à coleção de cultura da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora, MG. As culturas estoque foram mantidas congeladas 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) durante o desenvolvimento do trabalho.

## **2.4 Padronização e preparo dos inóculos**

As cepas foram reativadas transferindo-se alíquotas de 10 µL das culturas estoque para tubos contendo 3 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubação a 37°C/24 h. Os inóculos foram padronizados em 10<sup>8</sup> UFC/mL, por meio da elaboração de curva de crescimento; o desenvolvimento dos microorganismos foi acompanhado pela leitura da absorbância (D.O. 600nm) e contagem de células viáveis por plaqueamento por microgota em ágar tripton de soja (TSA). As placas foram incubadas a 37°C/24h.

## **2.5 Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e mínimas bactericidas (CMB) de óleos essenciais sobre células planctônicas**

As concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de microdiluição de 96 cavidades de poliestireno, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003).

Em cada cavidade da placa de microdiluição foram adicionados inicialmente 100 µL de caldo tripton de soja (TSB) acrescido de 0,5% de Tween 80 (TSB+TW). Em seguida, 100 µL das soluções foram acrescidas nas cavidades correspondentes à coluna 1 e linha A, transferindo-se 100 µL para a linha seguinte após a homogeneização e assim sucessivamente, desprezando-se os 100 µL finais, obtendo-se, assim, concentrações finais dos óleos essenciais variando de 10% a 0,078%. Alíquotas de 10 µL das culturas bacterianas padronizadas foram inoculadas nas cavidades.

Foram realizadas três repetições em triplicata, com dois controles para cada óleo essencial testado, o controle negativo, contendo TSB+TW e diferentes

concentrações de óleos essenciais; e o controle positivo, contendo TSB+TW e inóculo.

As placas foram vedadas e incubadas a 37 °C/ 24h. A absorvância (D.O. 620 nm) foi lida, e as menores concentrações de óleos essenciais, capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, foram denominadas de CMI. Em seguida, 10 µL da cultura de cada cavidade foi plaqueada em TSA empregando-se a técnica de migrogota e incubada a 37°C por até 24h. As menores concentrações de óleos essenciais que promoveram a ausência de UFC foram denominadas de CMB.

## **2.6 Determinação da Concentração Mínima Bactericida de óleos essenciais sobre biofilmes (CMB<sub>B</sub>)**

Os óleos essenciais selecionados para a continuidade do trabalho foram os de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora* e *Litsea cubeba* por apresentarem maior eficiência antimicrobiana sobre as células planctônicas.

Os biofilmes das duas cepas de *S. aureus* foram formados nas cavidades de poliestireno pela adição de 150 µL de TSB e 50 µL das culturas padronizadas com subsequente incubação das placas a 37°C/72h. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução salina 0,85% (m/v) para remoção das células não aderidas. Após a lavagem, 200 µL das soluções dos óleos essenciais, em concentrações que variaram de 0,078% a 10%, foram adicionadas às cavidades. As soluções foram preparadas pela homogeneização vigorosa por 2 minutos em agitador tipo vórtex dos óleos essenciais em água destilada estéril acrescentada de 0,5% (v/v) de Tween 80. Após 20 minutos de contato, as soluções antimicrobianas foram removidas das cavidades, que foram lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento das culturas em TSA e

incubadas a 37°C/24h e determinada as concentrações de óleos essenciais capazes de matar o biofilme, sendo essa considerada a Concentração Mínima Bactericida do Biofilme (CMB<sub>B</sub>). O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

### **2.7 Estudo do sinergismo entre os óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis**

O sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* foi estudado empregando-se as CMB (células planctônicas) e CMB<sub>B</sub> (biofilme) das duas cepas de *S. aureus*. Na Tabela 1 encontram-se os diferentes ensaios utilizados.

Tabela 2 Planejamento experimental para avaliação da ação antimicrobiana sinérgica entre os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora* e *Litsea cubeba* sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702

Ensaio	Óleo A	Óleo B	Óleo C
1	100	-	-
2	-	100	-
3	-	-	100
4	50	50	-
5	50	-	50
6	-	50	50
7	67	17	17
8	17	67	17
9	17	17	67
10	33	33	33

100 referentes à CMB (células planctônicas) e CMB<sub>B</sub> (células sésseis) de cada óleo essencial estudado. Demais números representam as proporções de óleos essenciais utilizadas nos ensaios baseadas nas CMB e CMB<sub>B</sub>

A ação bactericida das diferentes combinações dos óleos essenciais sobre as células planctônicas foi avaliada em microtubos, onde soluções das combinações dos óleos foram preparadas em TSB+TW pela homogeneização vigorosa por 2 min. em agitador tipo vórtex. Após homogeneização, 80 µL das culturas padronizadas de *S. aureus* foram inoculadas nos microtubos que foram incubados a 37°C por 24h. Após esse período, alíquotas de 10 µL das culturas foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37°C por 24h.

Após formação dos biofilmes das culturas de *S. aureus* em microplacas de poliestireno como mencionado anteriormente, esses foram expostos às diferentes combinações dos óleos essenciais (Tabela 2).

Após a lavagem, 200 µL das soluções dos óleos essenciais foram adicionadas às cavidades. As soluções foram preparadas pela homogeneização vigorosa por 2 min. em agitador tipo vórtex dos óleos essenciais em água destilada estéril acrescentada de 0,5% (v/v) de Tween 80. Após 20 min. de contato, as soluções antimicrobianas foram removidas das cavidades, que foram lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento das culturas em TSA e incubadas a 37°C/24h

Em ambos os experimentos, foram realizadas três repetições em triplicata, com dois controles para cada combinação de óleos essenciais testados, o controle negativo, contendo TSB+TW e diferentes concentrações de óleos essenciais; e o controle positivo, contendo TSB+TW e inóculo.

## **2.8 Ação antimicrobiana de soluções de óleos essenciais sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* formados sobre aço inoxidável**

Soluções sanificantes a base de óleos essenciais foram testadas sobre o biofilme formado por *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável.

### **2.8.1 Higienização dos cupons**

Para os ensaios envolvendo a formação de biofilmes foram utilizados cupons de prova feita em aço inoxidável, AISI 304 (#4), (de dimensões 1 x 8 x 18 mm). Os cupons foram imersos em solução comercial de ácido peracético 0,3% por 30 min. sob agitação de 50 rpm a 50 °C. Em seguida foram rinsados por imersão em água destilada estéril a 80 °C por 5 min. e a temperatura ambiente por 1 min., sob agitação de 50 rpm. Os cupons foram secos em estufa

de secagem a 40 °C por 2 h e autoclavados por 15 min. a 121 °C (OULAHAL et al., 2008).

### **2.8.2 Formação de biofilmes de *Staphylococcus aureus***

Os biofilmes foram formados em placas de Petri de 140 mm de diâmetro, contendo 60 mL de leite UAT desnatado inoculado com  $10^8$  UFC/mL de cada cultura de *S. aureus*. Em cada placa foram adicionados cerca de aproximadamente 15 cupons de aço inoxidável e incubados a 37°C, sob agitação branda (50 rpm) por 72 h (3dias).

A enumeração das células aderidas foi realizada após as 72 horas de incubação dos cupons. Estes foram retirados da placa de Petri, lavados com solução salina por 5x, para a eliminação de células não aderidas, e o biofilme foi removido utilizando-se *swab* padronizado esterilizado. Os *swabs* foram colocados em tubos contendo 10 mL água peptonada 0,1% (m/v) e agitados em agitador tipo vórtex por 2 min. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram inoculadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas, os resultados da contagem foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup> (JOSEPH et al., 2001).

Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

### **2.8.3 Tratamento dos biofilmes com as soluções de óleos essenciais e detergentes sanificantes**

Após a formação de biofilmes de *S. aureus* sobre a superfície de aço inoxidável em leite desnatado (três dias de cultivo) foram retirados 6 cupons da placa de Petri, que foram rinsados com solução salina 0,85% (m/v) por 5 vezes, eliminando-se as células não aderidas, e imersos por 20 min. nas soluções descritas na Tabela 3, em temperatura ambiente.

A concentração dos óleos essenciais testados foi definida pela metodologia anterior do (item 2.6) de acordo com os ensaios de 1 a 10 baseados na CMB<sub>B</sub>.

Tabela 3 Soluções de óleos essenciais de *Cinnamomun cassia*, *Cinnamomun camphora* e *Litsea cubeba* e detergente enzimático utilizadas no tratamento de biofilmes de *S. aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702

<i>S. aureus</i>	Tratamentos	Detergente enzimático	Óleo essencial (%)		
			<i>C. cassia</i>	<i>C. camphora</i>	<i>L. Cubeba</i>
ATCC 5674	TRAT1	0,4%	0,4125	0,825	0,825
	TRAT2		0,4125	0,825	0,825
	TRAT3		0,837	0,425	0,425
	TRAT4	0,4%			
ATCC 8702	TRAT1	0.4%	0,825	1,650	0,825
	TRAT2		0,825	1,650	0,825
	TRAT3		1,675	0,850	0,425
	TRAT4	0,4%	-	-	-

As soluções de óleos essenciais foram preparadas em água destilada estéril adicionada de 0,5% (v/v) Tween 80. O controle foi constituído de água destilada estéril adicionada de 0,5% (v/v) Tween 80. O detergente enzimático utilizado foi ENZIMAVIC DT4, componentes ativo: Amilase, Lípases, Protease e Carbohidrase.

Após a exposição às soluções, os cupons foram retirados, rinsados com água destilada e as superfícies foram amostradas empregando-se a técnica de esfregaço com *swab* de algodão padronizado esterilizado. Os *swabs* foram transferidos para tubos contendo água peptonada 0,1% (m/v) e submetidos à agitação por 2 minutos em agitador tipo vórtex. Os *swabs* foram colocados em

tubos contendo 10 mL água peptonada 0,1% (m/v) e agitados em agitador tipo vórtex por 2 min.. Alíquotas de 0,1 mL das diluições adequadas foram inoculadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 horas, os resultados foram expressos em UFC/cm<sup>2</sup> (JOSEPH et al., 2001) adaptado.

O experimento foi realizado com três repetições e em triplicata.

## **2.9 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento inteiramente casualizados; 4x1 (antimicrobianos e controle x tempo de contato); o tempo de contato foi de 20 minutos. Foram feitas 3 repetições, e os dados foram avaliados utilizando o programa SISVAR. Havendo diferença significativa fez-se o teste de Scott-knott.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702

As CMI e CMB dos óleos essenciais sobre as duas cepas de *S. aureus* no estado planctônico são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 Concentrações Mínima Inibitórias e Mínimas Bactericidas de diferentes óleos essenciais sobre *S. aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702

Óleos essenciais	<i>S. aureus</i> ATCC 5674		<i>S. aureus</i> ATCC 8702	
	CMI (%)	CMB (%)	CMI (%)	CMB (%)
<i>Cinnamomum cassia</i>	0,3125	0,3125	0,3125	2,5
<i>Cinnamomum camphora</i>	0,63	1,25	2,5	5
<i>Litsea cubeba</i>	0,63	0,63	1,25	1,25
<i>Origanum vulgare</i>	1,25	5	2,5	2,5
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,25	5	2,5	5
<i>Thymus vulgaris</i>	1,25	5	1,25	5
<i>Syzygium aromaticum</i>	1,25	5	1,25	2,5

CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: concentração Mínima Bactericida

Observou-se que as duas cepas de *S. aureus* apresentaram resistências diferentes aos óleos essenciais testados. De maneira geral a cepa ATCC 8702 foi mais resistente aos óleos essenciais do que a ATCC 5674. Observou-se também que exceto para o óleo de *C. cassia* e *L. cubeba* as CMB para a cepa ATCC 5674 foram maiores que as CMI. Já para a *S. aureus* ATCC 8702 as CMI e CMB foram iguais apenas para os óleos de *O. vulgare* e *L. cubeba*.

Dentre os óleos essenciais testados, foram selecionados os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* para avaliação antimicrobiana

sobre as células sésseis. Estes óleos foram selecionados, uma vez que, para a cepa ATCC 5674 as CMB foram mais baixas do que para os outros óleos e para a cepa ATCC 8702, exceto para *C. camphora* (CMB de 5%) as CMB também foram as mais baixas.

As atividades antimicrobianas (CMB<sub>B</sub>) dos óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* sobre biofilmes de *S. aureus* em microplaca de poliestireno são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Concentrações mínimas bactericidas (CMB<sub>B</sub>) dos óleos essenciais sobre biofilmes de *S. aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702

Óleos essenciais		CMB <sub>B</sub> (%)		
<i>Cinnamomum cassia</i>	<b>ATCC</b>	1,25	<b>ATCC</b>	2,5
<i>Cinnamomum camphora</i>	<b>5674</b>	2,5	<b>8702</b>	5,0
<i>Litsea cubeba</i>		2,5		2,5

Os resultados mostram diferença de comportamento entre as duas cepas quando em biofilme. A cepa ATCC 5674, quando em biofilme, mostrou-se mais resistente aos óleos essenciais testados do que quando em estado planctônico. Assim, os óleos essenciais de *C. cassia* e *L. cubeba* apresentaram atividade biocida sobre o biofilme de *S. aureus* ATCC 5674 em concentrações 4 vezes maiores do que aquelas para células planctônicas, já para o óleo de *C. camphora* a concentração foi duas vezes maior. Entretanto, a resposta de sensibilidade aos óleos essenciais do biofilme formado pela cepa ATCC 8702 foi diferente, sendo observada menor atividade antimicrobiana apenas do óleo essencial de *L. cubeba*, onde a concentração biocida aumentou de 1,25% para 2,5% (2 vezes) da forma planctônica para a sésil, respectivamente.

Visando diminuir as concentrações de óleos essenciais a serem utilizadas nas soluções sanificantes as CMB e CMB<sub>B</sub> dos óleos essenciais, foram utilizadas para o estudo de seu sinergismo sobre células planctônicas e sésseis,

respectivamente. As proporções dos óleos essenciais e combinações utilizadas foram aquelas descritas na Tabela 2.

Foi observado grande sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora* e *L. cubeba* sobre *S. aureus* ATCC 5674 e 8702, não sendo observado crescimento tanto das células planctônicas quanto dos biofilmes formados na microplaca de poliestireno, em todos os tratamentos. O sinergismo foi observado visto que baixas concentrações de óleos essenciais foram utilizadas favorecendo sua ação em conjunto.

Ambas as cepas formaram biofilmes, atingindo 7 Log UFC/cm<sup>2</sup>, sobre os cupons de aço inoxidável, após 72h de cultivo a 37°C em leite desnatado UAT, sendo esses submetidos a tratamentos com diferentes soluções de óleos essenciais de *C. cassia*, *L. cubeba* e *C. camphora* e solução detergente.

A Tabela 6 mostra os valores médios do número de células viáveis (Log UFC/cm<sup>2</sup>) nos cupons de aço inoxidável após sua exposição a diferentes soluções de óleos essenciais e detergente. As duas cepas de *S. aureus* formaram biofilme em cupons de aço inoxidável imersos em leite desnatado UAT após 72 horas de cultivo a 37 °C.

Tabela 6 Número de células viáveis (Log UFC/cm<sup>2</sup>) de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC8702 na superfície de cupons de aço inoxidável após tratamento com diferentes soluções sanificantes a base de óleos essenciais

Tratamentos	Média log UFC/cm <sup>2</sup>	Média log UFC/cm <sup>2</sup>
	<i>S. aureus</i> 5674	<i>S. aureus</i> 8702
TRAT1	3,447 ± 0,13 A	3,577 ± 0,26 A
TRAT2	3,735 ± 0,16 A	3,577 ± 0,14 A
TRAT3	4,013 ± 0,49 A	3,842 ± 0,55 A
TRAT4	5,882 ± 0,16 B	5,668 ± 0,57 B
Controle	5,889 ± 0,13 B	5,923 ± 0,15 B

Médias seguidas pelas mesmas letras, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O tratamento 1 (TRAT1) corresponde à combinação dos óleos essenciais testados, 33% da CMB<sub>B</sub> dos óleos essenciais *C. cassia*, *Litsea cubeba* e *C. Camphora* em combinação com o detergente enzimático (diluído na concentração do fabricante). O tratamento 2 (TRAT2) foi a combinação dos óleos essenciais testando a 33% da CMB<sub>B</sub>. O tratamento 3 (TRAT3) foi a combinação dos óleos essenciais em relação a CMB<sub>B</sub>, com 67% de *C. cassia*, 17% *Litsea cubeba* e 17% *C. Camphora*. E o tratamento 4 (TRAT4) corresponde ao detergente enzimático.

Os resultados foram similares para as duas cepas de *S. aureus*, não sendo observada a eliminação dos biofilmes das superfícies, em nenhum dos tratamentos, comportamento diferente daqueles obtidos nas microplacas de poliestireno. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos 1, 2 e 3 para ambas as cepas, sendo a redução média de Log de UFC/cm<sup>2</sup> para *S. aureus* ATCC 5674 de 3,24 Log e para a cepa ATCC 8702 de 3,33 Log. Observa-se que a associação entre detergente enzimático e óleos essenciais (TRAT1) não interferiu no potencial biocida da solução sanificante, uma vez que não foi observada diferença significativa na redução de células entre os tratamentos sem detergente enzimático. A não interferência do detergente enzimático sobre a redução das células em biofilme pode ser confirmada comparando-se o TRAT4 (solução de detergente enzimático) com o controle (água destilada), onde não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

*Staphylococcus aureus* é grande alvo de pesquisas por ser capaz de afetar homens e animais, tendo papel importante na etiologia da mastite. Muitos trabalhos relatam sua capacidade de apresentar resistência aos antimicrobianos normalmente utilizados (AGOSTINIS; MELLO; MARTINS, 2012; MEDEIROS et al., 2009; RAPINI et al., 2004). Assim, a busca de novos agentes

antimicrobianos, principalmente aqueles “ditos naturais”, apresenta grande apelo para a indústria.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está diretamente relacionada aos seus constituintes e seus compostos majoritários. A Tabela 7 mostra os compostos majoritários dos óleos essenciais utilizados neste trabalho.

Tabela 7 Óleos essenciais e seus respectivos compostos majoritários

<b>Óleos Essenciais</b>	<b>Compostos majoritários</b>
<i>Cinnamomum cassia</i>	Aldeído cinâmico
<i>Cinnamomum camphora</i>	Linalol
<i>Litsea cubeba</i>	Citral
<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1-8 cineol
<i>Thymus vulgaris</i>	Timol
<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol

Geralmente as bactérias Gram positivas são mais susceptíveis aos óleos essenciais do que as Gram negativas (ANDRADE et al., 2012), uma vez que a estrutura da parede celular das bactérias Gram positivas permite que moléculas hidrofóbicas penetrem facilmente atuando tanto na parede celular quanto no citoplasma, já nas bactérias Gram negativas, a presença da membrana externa dificulta a passagem dos compostos hidrofóbicos dos óleos essenciais (NAZZARO et al., 2013). A ação dos óleos essenciais nas células bacterianas inclui a destruição da parede celular e da membrana plasmática, danos às proteínas de membrana, perturbações sobre a força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e coagulação do conteúdo celular (BURT, 2004; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Ao se comparar a sensibilidade de *S. aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702 aos óleos essenciais testados, observa-se comportamento diferente entre as duas cepas, sendo *S. aureus* ATCC 5674 mais susceptível à ação dos

óleos essenciais. Estudo realizado por Di Ciccio et al. (2015) com 67 isolados de *S. aureus* mostra que a hidrofobicidade da superfície celular variou de altamente hidrofóbica, moderadamente hidrofóbica até hidrofílica. Assim, provavelmente a superfície celular de *S. aureus* ATCC 5674 possui maior hidrofobicidade, facilitando a passagem dos compostos dos óleos essenciais.

As células de ambas as cepas de *S. aureus* em biofilme apresentaram-se mais resistentes aos óleos essenciais do que as células planctônicas, o que está de acordo com a literatura científica da área. Essa variação pode ser explicada pela diferença de comportamento entre células sésseis e células planctônicas. Bactérias em biofilmes podem ser 10-1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos, comparadas a células planctônicas (SIMÕES, 2011). Um dos fatores responsáveis por essa resistência pode ser a camada de exopolissacarídeo (dificulta a difusão), e a expressão de fatores específicos de proteção de células em biofilme, tornando este fisiologicamente distinto (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002; VIDAL; RAGOT; THIBAUT, 1997).

Pereira (2014) em seu trabalho sobre óleos essenciais de orégano e tomilho e dos compostos timol e carvacrol sobre *S. Typhimurium* constatou que estes apresentaram atividade bactericida sobre células planctônicas de *S. Typhimurium* e esta bactéria foi mais sensível ao óleo essencial de tomilho a 0,25% (v/v). Quando formado o biofilme de *S. Typhimurium* em placas também de poliestireno, as células sésseis apresentaram resultados diferentes, superiores, comparados às células planctônicas, como neste trabalho. Contudo, Oliveira et al. (2012), estudando o efeito bactericida dos óleos essenciais de *C. flexuosus* e *C. cassia* sobre células sésseis e planctônicas de *L. monocytogenes* e *E. coli* encontraram resultados similares entre ambas as células, tendo o óleo essencial de *C. flexuosus* apresentado uma atividade antimicrobiana de 1,0% (v/v) sobre *L. monocytogenes*.

Os compostos majoritários do *C. cassia*, *C. camphora*, *Litsea cubeba* são, respectivamente, aldeído cinâmico, linalol e citral. Os óleos essenciais utilizados pertencem a grupos biossintéticos distintos. O linalol e o citral fazem parte do grupo dos monoterpenos e o aldeído cinâmico faz parte dos compostos aromáticos. O citral e o aldeído cinâmico são aldeídos, sendo o citral um aldeído acíclico e o aldeído cinâmico um composto aromático. O linalol é um álcool (BAKKALI et al., 2008). Os aldeídos normalmente causam danos à membrana plasmática, pois provocam danos a lipídeos e proteínas (BURT, 2004).

O óleo essencial de *C. cassia* foi o que apresentou melhor resultado como bactericida, tanto em células planctônicas como em células sésseis em *S. aureus* 5674. Em células planctônicas o óleo essencial de *C. cassia* apresentou CMB de 0,3125 % (v/v) e em células sésseis de 1,25 % (v/v) sendo estas concentrações as menores.

Para *S. aureus* ATCC 8702 na forma planctônica, a menor concentração de óleo essencial foi de *L. cubeba* 1,25% (v/v), e em células sésseis foi de 2,5% (v/v) tanto para óleo essencial de *L. cubeba* como também para o óleo essencial de canela. Isso comprova a ação dos aldeídos sobre a membrana plasmática das bactérias.

Bakkali et al. (2008), ao discutirem os dados da análise cromatográfica, levantam o questionamento sobre a ação dos óleos essenciais. Considerando que óleos essenciais são misturas complexas de inúmeras moléculas, seus efeitos biológicos podem ser o resultado do sinergismo de todas as moléculas, como podem refletir apenas ação das moléculas principais presentes em maiores concentrações. É provável que vários componentes dos óleos essenciais desempenhem função na definição da fragrância, da densidade, da textura, da cor e, principalmente, na capacidade de penetração na célula (CAL, 2006). De acordo com o exposto acima, é mais indicado estudar o óleo essencial e suas

combinações em vez dos componentes em separado, desta forma, o sinergismo parece ter maior significado.

Perini et al. (2014) testaram a ação antimicrobiana da combinação de óleos essenciais de cravo botão, canela cássia e capim-limão sobre vários isolados de *S. aureus*, isoladas de mastite bovina e obtiveram CMI de 0,0097% (v/v). Este foi considerado bom resultado comparado aos resultados dos óleos essenciais testados separadamente, como o cravo botão que sozinho apresentou CMI de 0,3125% (v/v). Assim como no presente trabalho não houve crescimento dos micro-organismos testados submetidos à combinação dos óleos essenciais.

Millezi et al. (2012), avaliando a capacidade de formação de biofilme por *S. aureus* e *E. coli*, sobre polipropileno, constataram que após 3 horas de cultivo *S. aureus* já havia formado biofilme e, após 48 horas de cultivo, havia valores significativos, em relação ao número de células viáveis, comparando o biofilme formado por *E. coli* e *S. aureus*. No presente trabalho, o biofilme formado por *S. aureus* atingiu um valor significativo, 7 Log UFC/cm<sup>2</sup>, pois segundo Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) para se considerar biofilme é necessário o número mínimo de 10<sup>7</sup> UFC por cm<sup>2</sup>. Porém, outros pesquisadores consideram valores menores, como Ronner e Wong (1993) que consideram como biofilme um número de células aderidas de 10<sup>5</sup> UFC por cm<sup>2</sup>

Para remover os biofilmes, os agentes bactericidas devem penetrar a camada de exopolissacarídeo (EPS) e ter acesso à célula bacteriana. Enzimas e detergentes podem ser utilizados como agentes sinérgicos para o aumento da eficácia na remoção dos biofilmes, estes podem causar a hidrólise de polissacarídeos (MEYER, 2003). Com esse objetivo o detergente enzimático foi utilizado em combinação aos óleos essenciais, entretanto esse tratamento (TRAT1) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) dos outros tratamentos (TRAT2 e TRAT3).

Apesar da combinação dos óleos essenciais testados terem eliminados os biofilmes formados por *S. aureus* nas microplacas de poliestireno, quando os biofilmes foram formados em cupons de aço inoxidável tendo o leite desnatado como substrato, houve crescimento de células viáveis de *S. aureus* após a sanificação das superfícies. O leite é um substrato extremamente rico, possibilitando o rápido crescimento dos micro-organismos. A formação do biofilme no leite em 3 dias de incubação à temperatura ideal para o crescimento de *S. aureus*, dificultou a sanificação e eliminação do biofilme formado por *S. aureus* 5674 e *S. aureus* 8702. Isso pode ter sido em razão da intensa matéria orgânica formada sobre a superfície de aço inoxidável.

A maior disponibilidade de nutrientes em alimentos, quando comparados com meios laboratoriais, pode permitir às bactérias o reparo de danos celulares mais rapidamente (GILL et al., 2002). Inúmeros estudos têm registrado o efeito dos alimentos sobre a resistência microbiana a óleos essenciais, mas nenhum parece tê-lo quantificado, ou explicado o seu mecanismo, apesar de sugestões terem sido feitas para as possíveis causas (BURT, 2004). Não apenas as propriedades intrínsecas dos alimentos (gordura/proteínas/teor de água, antioxidantes, conservantes, pH, sal e outros aditivos) são relevantes neste aspecto, as características extrínsecas (temperatura, embalagem à vácuo/gás/ar, características dos micro-organismos) podem também influenciar na sensibilidade bacteriana (SHELEF, 1983; TASSOU; DROSINOS; NYCHAS, 1995).

Biofilmes de *S. aureus* crescem tanto sobre condições estáticas quanto de fluxo e consistem de uma densa camada de células com uma elaborada matriz contendo vários tipos de polímeros (ABEE et al., 2011). De um modo geral, biofilmes são muito difíceis de erradicar, e vários mecanismos têm sido propostos para explicar o aumento da resistência dos biofilmes a agente antimicrobianos e seu caráter impenetrável.

Valeriano et al. (2012) avaliaram soluções sanificantes à base de óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus* sobre biofilme formado por *Salmonella enteritidis* tendo como superfície também o aço inoxidável, sendo observado o potencial desses óleos como soluções sanificantes para serem utilizados na indústria de alimentos. O biofilme de *S. enteritidis* foi formado tendo o leite como substrato e após 20 minutos de contato da superfície com a solução sanificante à base de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus*, obteve-se a redução de 6 log UFC/cm<sup>2</sup>. Nesse trabalho, apesar das soluções sanificantes à base dos óleos essenciais não terem eliminado os biofilmes formados por *S. aureus* ATCC 5674 e *S. aureus* ATCC 8702, obteve-se uma redução de cerca de 2,5 log UFC/cm<sup>2</sup> em ambas as estirpes, e esse valor foi significativo (p<0,05) em relação ao controle.

Caixeta et al. (2012), estudando a formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* em aço inoxidável, em leite desnatado, constataram a habilidade desses micro-organismos em resistir à ação de sanificantes convencionais. Os autores testaram peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dicloroisocianurato de sódio e ácido peracético e não observaram efeito significativo dos sanificantes sobre o número de células aderidas após 1 minuto de exposição. Sanificantes químicos são ainda os mais utilizados pelas indústrias alimentícias ocorrendo, muitas vezes, ineficiência no controle de biofilmes, enfatizando o uso de novas alternativas para combater os biofilmes.

Oliveira et al. (2010) testaram soluções sanificantes à base de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* sobre biofilme de *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável e constataram que após 60 minutos de exposição, as células, aderidas à superfície, foram reduzidas em 100% (5,64 Log UFC cm<sup>2</sup>). No presente trabalho, as soluções sanificantes à base da combinação dos óleos essenciais foram testadas, durante 20 minutos, e esse tempo já foi capaz de reduzir as células sésseis de *S. aureus*.

As bactérias, uma vez aderidas a superfícies, tornam-se mais difíceis de serem removidas e promover uma boa sanificação. Soluções à base de óleos essenciais se mostram alternativas promissoras no controle de biofilmes microbianos (OLIVEIRA et al., 2010; VALERIANO et al., 2012).

De acordo com os resultados obtidos, o potencial dos óleos essenciais foi comprovado para serem usados como antibacterianos e soluções sanificantes de um modo geral. Porém as bactérias mostram-se diferentes quando expostas a agentes estressantes podendo variar seu comportamento, entre espécies ou cepas de uma mesma espécie. O controle eficiente dos biofilmes tornou-se um desafio enfatizando que mais estudos devem ser feitos para melhor controlá-los em níveis seguros de saúde pública.

#### 4 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais testados, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum camphora*, *Litsea cubeba*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e *Syzygium aromaticum* apresentaram atividade bactericida sobre células planctônicas de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *Staphylococcus aureus* 8702 sendo, os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora*, *Litsea cubeba* selecionados para serem testados em células sésseis.

Os óleos essenciais de *C. cassia*, *C. camphora*, *Litsea cubeba* apresentaram atividade antimicrobiana sobre biofilmes de *Staphylococcus aureus* ATCC 5674 e *Staphylococcus aureus* 8702, e a combinação desses óleos apresentaram resultados promissores para serem utilizados como sanificantes nas indústrias de alimentos, com uma redução de cerca de 2,5 log UFC/ cm<sup>2</sup> sobre o biofilme formado por ambas as cepas avaliadas.

## REFERÊNCIAS

- ABEE, T. et al. Biofilm formation and dispersal in gram positive bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.22, n. 2, p. 172-179, Apr. 2011.
- AGOSTINIS, R. A.; MELLO, P. L.; MARTINS, L. A. Importância do mapeamento e monitoramento do perfil de resistência e detecção dos genes de resistência de *Staphylococcus* sp. relacionados à mastite bovina. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 57-65, jan./jun. 2012.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum Zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- 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**, Ames, v.61, n.7, p.833-838, July 1998.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Spring Science Business, 2008. 276 p. (Food Science Text Series).
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CAIXETA, D. S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 142-150, jan./mar. 2012.
- CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medica**, Stuttgart, v.72, n. 4, p.311-316, 2006.

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

DI CICCIO, P. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**, Guildford, v. 50, p. 930-936, Apr. 2015.

GILBERT, P.; ALLISON, D.G.; MCBAIN, A.J. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, p.98S-110S, 2002. Supplement.

GILL, A.O. et al. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.73, n. 1, p.83-92, Feb. 2002.

JAY, M. J. Gastronterite estafilocócica. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 471-485.

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, 2001.

LANCIOTTI, R. et al. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 15, n.3/4, p. 201-208, 2004.

LAWRENCE, J. R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, Oct. 1991.

MEDEIROS, E. S. et al. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 71-75, 2009.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 51, n. 4, p. 249-253, June 2003.

MILLEZI, A. F. et al. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 32, n. 3, p. 351-359, Aug. 2012.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 8<sup>th</sup> ed. Wayne, 2003. 249 p. (NCCLS Document, M2-A8).

NAZZARO, F. et al. Review effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, Nov. 2013.

OLIVEIRA, M. M. et al. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed in stainless steel surfaces. **European Food Research & Technology**, Berlin, v. 234, n. 5, p. 821-832, 2012.

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

PEREIRA, A. A. **Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp.** 2014. 90p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PERINI, S. et al. Antimicrobial activity of essential oils against pathogens isolated from bovine Mastitis. **Journal of Natural Products and Plant Resources**, Cincinnati, v. 4, n. 2, p. 6-15, 2014.

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

RAPINI, L. S. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

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

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, Westport, v.6, p.29-34, 1983.

SIMÕES, M. Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. **Current Medicinal Chemistry**, Wageningen, v.18, n. 14, p.2129-2145, May 2011.

TASSOU, C.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G. J.E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° C and 10° C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.78, n. 6, p.593-600, June 1995.

VALERIANO, C. et al. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 2, p.673-677, June 2012.

VIDAL, D.R.; RAGOT, C.; THIBAUT, F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v.55, n. 2, p.49-54, 1997.

## ANEXO

**ANEXO A - Tabelas referentes ao planejamento experimental das concentrações em % dos óleos essenciais testados de acordo com a tabela 1 do item 2.7**

Células plânctônicas			
<i>S. aureus</i> 5674	<i>C. cassia</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. camphora</i>
1	0,3125	0	0
2	0	0,63	0
3	0	0	1,25
4	0,15625	0,315	0
5	0,15625	0	0,625
6	0	0,315	0,625
7	0,209375	0,1071	0,2125
8	0,053125	0,4221	0,2125
9	0,053125	0,1071	0,8375
10	0,103125	0,2079	0,4125
<i>S. aureus</i> 8702	<i>C. cassia</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. camphora</i>
1	2,5	0	0
2	0	1,25	0
3	0	0	5
4	1,25	0,625	0
5	1,25	0	2,5
6	0	0,625	2,5
7	1,675	0,2125	0,85
8	0,425	0,8375	0,85
9	0,425	0,2125	3,35
10	0,825	0,4125	1,65

Células sésseis			
<i>S. aureus</i> 5674	<i>C. cassia</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. camphora</i>
1	1,25	0	0
2	0	2,5	0
3	0	0	2,5
4	0,625	1,25	0
5	0,625	0	1,25
6	0	1,25	1,25
7	0,8375	0,425	0,425
8	0,2125	1,675	0,425
9	0,2125	0,425	1,675
10	0,4125	0,825	0,825
<i>S. aureus</i> 8702	<i>C. cassia</i>	<i>L. cubeba</i>	<i>C. camphora</i>
1	2,5	0	0
2	0	2,5	0
3	0	0	5
4	1,25	1,25	0
5	1,25	0	2,5
6	0	1,25	2,5
7	1,675	0,425	0,85
8	0,425	1,675	0,85
9	0,425	0,425	3,35
10	0,825	0,825	1,65