



ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS JÚNIOR

**ATUAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
BIOFILME DE *Staphylococcus aureus* EM
SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL E
POLIPROPILENO**

LAVRAS - MG

2011

ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS JÚNIOR

**ATUAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILME DE
Staphylococcus aureus EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL E
POLIPROPILENO**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientadores

Dra. Maria das Graças Cardoso

Dr. Eduardo Alves

LAVRAS – MG

2011

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

Santos Júnior, Alexandre Cristiano.

Atuação de óleos essenciais sobre biofilme de *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inoxidável e polipropileno / Alexandre Cristiano Santos Júnior. – Lavras: UFLA, 2011.

74 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Potencial antibacteriano. 3. Soluções
sanificantes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

ALEXANDRE CRISTIANO SANTOS JÚNIOR

**ATUAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILME DE
Staphylococcus aureus EM SUPERFÍCIES DE AÇO INOXIDÁVEL E
POLIPROPILENO**

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

APROVADA em 22 de fevereiro de 2011.

Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Dr. Cleube Andrade Boari UFVJM

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG

2011

A minha Família e Amigos,

OFEREÇO

À Glória de Deus,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e por ter me agraciado com o presente da vida e ter me concedido a capacidade necessária para chegar ao final deste curso.

Aos meus pais, que sempre me deram total e irrestrito apoio, em todos os momentos da minha vida e que me ensinaram como ser um homem. A minha irmã, Cíntia, pelo incentivo, motivação, companheirismo e carinho constante.

A minha orientadora, Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo apoio, amor, dedicação, paciência e, principalmente, pelos grandes ensinamentos, em microbiologia e como pessoa.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado e também aos professores.

Aos professores, em especial, aos professores Maria das Graças Cardoso e Eduardo Alves, amigos e colegas dos Laboratórios de Química do DQI, Microbiologia DCA e Microscopia Eletrônica DFP, pela colaboração e presteza sempre.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do DCA, em especial à laboratorista Eliane Alcântara, Query, Rodrigo e Alessandra Salinema, que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

Um agradecimento especial aos grandes amigos e irmãos em Cristo a quem ofereço este trabalho, pelas orações e amizade sempre sincera e apoio em todas as horas.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela bolsa de estudos e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, só tenho a agradecer.

Muito Obrigado!

RESUMO

Foi estudado o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), e sua combinação, sobre biofilme bacteriano formado por *Staphylococcus aureus* em superfície de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno. O óleo essencial de cravo-da-índia foi extraído por meio de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado e o de tomilho foi adquirido de uma empresa especializada. Ambos os óleos foram submetidos à cromatografia em fase gasosa para identificação de seus constituintes. O teste da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizado baseado no método de difusão em disco, obtendo-se, assim, a concentração mínima inibitória (CMI), que foi igual a 0,10% v/v, para os dois óleos e sua combinação. A partir deste resultado, foi estipulada a concentração mínima para a formulação de soluções sanificantes contendo óleos essenciais e uma solução controle sem a adição destes óleos, para serem aplicadas em superfícies de aço inoxidável e polipropileno contendo biofilme bacteriano formado por *Staphylococcus aureus*. O biofilme foi formado durante 10 dias, utilizando-se o caldo tripton de soja (TSB) como substrato e inoculado com uma alíquota de 10^8 UFC/mL da cepa. Eletromicrografias de varredura foram realizadas com o objetivo de observar a morfologia e possíveis alterações celulares provocadas pela ação dos agentes sanificantes sobre o biofilme formado nas superfícies. O principal componente identificado do óleo essencial de cravo-da-índia foi o eugenol, enquanto do tomilho foram timol e carvacrol. Todas as soluções sanificantes à base de óleos essenciais mostraram potencial antibacteriano superior à solução sanificante controle, sendo a solução feita da combinação dos óleos essenciais mais efetiva que as soluções à base de tomilho e cravo, individualmente. Pela análise das eletromicrografias de varredura obtidas, foram observadas alterações estruturais nas superfícies celulares. Os óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho e sua combinação mostraram-se efetivos na redução de biofilme bacteriano formado por *Staphylococcus aureus* em superfícies aço inoxidável AISI 304 e polipropileno.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Potencial antibacteriano. Soluções sanificantes.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate antimicrobial effect of clove (*Syzygium aromaticum*), and thyme (*Thymus vulgaris*) essential oils, and combination of both on *Staphylococcus aureus* bacterial biofilm formed over stainless AISI 304 and polypropylene surfaces. Clove essential oil was extracted through hidrodestilation process in modified Clavenger device; thyme essential oil was acquired from a supplier. Both oils were subjected to gas chromatography in order to identify their compounds. Antimicrobial activity *in vitro* test was carried out by Disc Diffusion method, this form, obtaining the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), that was 0,10% v/v for the both oils and their combination. From this result, minimal concentration was stipulated to formulate sanitizing solutions containing the essential oils and a control solution without essential oils addition, in order to apply on stainless and polypropylene surfaces with *Staphylococcus aureus* bacterial biofilm. This bacterial biofilm was formed throughout 10 days, using Tryptic Soy Broth (TSB) as substrate, and was inoculated a 10^8 UFC/mL aliquot from strain. Scanning electron microscopy was carried out in order to observe morphology and cellular changes induced by sanitizing agents on biofilm. Main compound identified from clove essential oil was eugenol, whereas from thyme essential oil was timol and carvacrol. All sanitizing solutions obtained from essential oils showed antibacterial potential higher than control solution, being the solution made by combination of both essential oils most effective than clove and thyme solutions individually. In scanning electron microscopy analysis was observed structural alterations at cellular surfaces. Essential oils of clove, thyme, and combination of both were effective in bacterial biofilm formed by *Staphylococcus aureus* on stainless AISI 304 and polypropylene.

Keywords: Essential oils. Antibacterial potential. Sanitizing solutions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana	17
Figura 2 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	19
Figura 3 Estrutura química do isopreno.....	20
Figura 4 Biossíntese de terpenos via DXPS	21
Figura 5 Aspecto geral do tomilho (<i>T. vulgaris</i>).....	23
Figura 6 Estruturas químicas do timol (A) e Carvacrol (B).....	24
Figura 7 Aspecto geral do craveiro (<i>S. aromaticum</i>) (A) e o cravo seco (B)	26
Figura 8 Estrutura química do eugenol.....	26
Figura 9 Etapas de formação do biofilme	29
Figura 10 Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração do óleo essencial de cravo-da-índia (<i>S. aromaticum</i>).....	36
Figura 11 Frasco óleo essencial de tomilho (<i>T. vulgaris</i>) comercializado no Brasil pela empresa Ferquima	37
Figura 12 Estrutura química do Eugenol	45
Figura 13 Estruturas químicas do timol (A), carvacrol (B), 1,8 cineol (C), terpineno (D), borneol (E) e mirceno (F)	47
Figura 14 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão em disco para os óleos essenciais de cravo-da-índia (A), tomilho (B) e sua combinação (C)	50
Figura 15 Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão do <i>Staphylococcus aureus</i> , após 240 horas de formação do biofilme, nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 (A) e polipropileno (B) .	55
Figura 16 Eletromicrografias de varredura mostrando a redução das células de <i>Staphylococcus aureus</i> nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 (A) e polipropileno (B).....	60
Figura 17 Eletromicrografias de varredura mostrando as alterações estruturais provocadas pela ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia (A e C) e tomilho (B e D) nas células de <i>Staphylococcus aureus</i> nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 (A,C e D) e polipropileno (B)	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das soluções sanificantes	41
Tabela 2	Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e sua combinação, frente ao <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Tabela 3	Número de células sésseis (Log UFC/cm ²) de <i>Staphylococcus aureus</i> quantificadas durante a formação do biofilme sobre as superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, com incubação a 37°C e utilizando meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato	54
Tabela 4	Número de células sésseis (Log UFC/cm ²) de <i>Staphylococcus aureus</i> , quantificadas nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, após 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais	58
Tabela 5	Redução do número de células sésseis de <i>Staphylococcus aureus</i> (Log UFC/cm ²) e em percentual, quantificadas nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, após 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais	59

LISTA DE ABREVIATURAS

v/v	Volume por volume
v/m	Volume por massa
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UFC/cm ²	Unidades formadoras de colônia por centímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Óleos essenciais	15
2.1.2	Aplicações dos óleos essenciais.....	22
2.2	Descrição botânica dos espécimes.....	23
2.2.1	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	23
2.2.2	Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	25
2.3	Biofilmes microbianos	27
2.3.1	Biofilmes na indústria	31
2.3.2	Superfícies envolvidas na formação do biofilme.....	32
2.4	Características gerais do <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Local e condução do experimento	35
3.2	Obtenção dos óleos essenciais	35
3.3	Microrganismo e preparação do inóculo	38
3.3.1	Microrganismo	38
3.3.2	Manutenção e padronização da cultura.....	38
3.3.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> de óleos essenciais	39
3.4	Formação do biofilme bacteriano em superfície de aço inoxidável e polipropileno.....	39
3.4.1	Higienização dos cupons.....	39
3.4.2	Adesão das células bacterianas.....	40
3.4.3	Enumeração das células aderidas.....	40
3.5	Preparo das soluções sanificantes.....	41
3.6	Tratamento dos biofilmes com soluções sanificantes contendo óleos essenciais em diferentes tempos de contato	42
3.7	Visualização das superfícies dos cupons por microscopia eletrônica de varredura.....	43
3.8	Delineamento experimental e análise estatística	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	Identificação dos constituintes dos óleos essenciais	45
4.2	Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI).....	48
4.4	Tratamento dos biofilmes com soluções sanificantes.....	57
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de alimentos, o termo “alimento seguro” refere-se à garantia da produção de um alimento seguro, cuja principal característica é a inocuidade, ou seja, livre de contaminantes de natureza química, física ou biológica ou, ainda, de quaisquer outros agentes que possam colocar em risco a saúde da população. Para prover ao consumidor um produto de qualidade e seguro, é essencial controlar as densidades populacionais de microrganismos nos alimentos e nos equipamentos utilizados em seu processamento. Assim, as indústrias de alimentos, geralmente, possuem programas efetivos de higienização que têm por finalidade garantir a qualidade sanitária final do produto e preservar a saúde do consumidor.

O processo de higienização adotado atualmente nas indústrias alimentícias é dividido em duas etapas: a limpeza e a sanificação. O objetivo primordial da limpeza é a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras, carboidratos e sais minerais. A sanificação tem por objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes a níveis considerados seguros. A limpeza, sem dúvida, reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios. Portanto, a sanificação é indispensável.

Uma superfície mal higienizada, somada à capacidade de adesão de um microrganismo, pode se tornar fonte potencial de contaminação e levar à formação de biofilmes microbianos. Várias espécies de microrganismos têm a capacidade de se organizarem em biofilmes na indústria de alimentos e, atualmente, as pesquisas nesta área têm sido orientadas no estudo de espécies de *Pseudomonas* e em patógenos de origem alimentar, como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus*. A presença desta bactéria ocorre, principalmente, em

plantas de processamento de leite e derivados, ocasionando implicações em questões de saúde pública.

A formação desses biofilmes nas superfícies de equipamentos e utensílios utilizados durante o processamento de alimentos resulta em graves problemas, pois o biofilme microbiano torna-se fonte potencial crônica de contaminação dos alimentos. Além disso, uma vez instalados, os biofilmes promovem o aumento da resistência das células microbianas que os compõem, dificultando, assim, a ação dos agentes sanificantes ou substâncias antimicrobianas.

Na busca de melhor entendimento do processo de formação do biofilme em diferentes superfícies, alteração de fisiologia, modificações genéticas e busca de agentes sanificantes e antimicrobianos alternativos, trabalhos devem ser gerados. Neste contexto, tem sido observado que os óleos essenciais encontrados em plantas condimentares apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes, o que tem despertado o interesse das indústrias alimentícias. O efeito inibitório desses óleos em microrganismos é uma alternativa para a redução do uso de aditivos químicos em alimentos e para a formulação de novos agentes sanificantes. Diversos estudos têm demonstrado que os óleos essenciais extraídos de folhas e de diferentes partes das plantas de várias espécies possuem elevada ação antimicrobiana. Estes trabalhos ainda evidenciam sua capacidade em atuar sobre biofilmes microbianos formados em superfícies distintas.

O estudo da ação de diferentes óleos essenciais sobre biofilme microbiano formado em diferentes superfícies é importante, pois sua eliminação é difícil, causando problemas principalmente de ordem econômica e à saúde pública. Como a eliminação destes biofilmes em superfícies é uma tarefa difícil, o procedimento de higienização deve ser analisado como um todo. Assim, o desenvolvimento de soluções sanificantes contendo óleos essenciais pode ser

uma alternativa para evitar a formação e ou eliminar biofilmes, podendo aperfeiçoar os resultados, minimizando os custos deste processo.

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: determinar a concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e sua combinação sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; avaliar a eficácia de soluções sanificantes formuladas à base dos óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho sobre biofilme de *S. aureus* formado em superfícies de aço inoxidável e polipropileno e avaliar os possíveis efeitos dos óleos essenciais sobre as células de *S. aureus* após tratamento com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor de água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SANTOS, 2007).

Os óleos essenciais dos condimentos apresentam diferentes compostos, que contribuem por apresentarem propriedades antimicrobianas e também dando ao alimento características de sabor e aroma especiais (ARIDOGAM et al., 2002). Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, que são uma mistura de substâncias lipídicas, obtidos, geralmente, de sementes.

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

Os óleos essenciais são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie

(GUIMARÃES et al., 2008). A composição final do óleo essencial é influenciada pelas condições climáticas do local de origem das plantas, além da temperatura de secagem do material vegetal, a qual pode levar a grandes perdas, por volatilização dos princípios ativos presentes nestes óleos (DORMAN; DEANS, 2000).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais é atribuída principalmente aos terpenoides e compostos fenólicos, como, por exemplo, o timol e o eugenol, que também puros demonstram alta atividade antibacteriana (BURT, 2004). Na literatura existem vários relatos da atividade bactericida de óleos essenciais, contudo, os mecanismos de ação destes no microrganismo ainda não estão totalmente elucidados (DI PASQUA et al., 2007; KALEMBA; KUNICKA, 2003; LAMBERT et al., 2001).

Burt (2004), em seu trabalho de revisão, sugere que o mecanismo de ação dos óleos essenciais sobre as bactérias está relacionado com a modificação da permeabilidade da membrana citoplasmática, danos a vários sistemas enzimáticos, interrupção da força próton motriz, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (Figura 1).

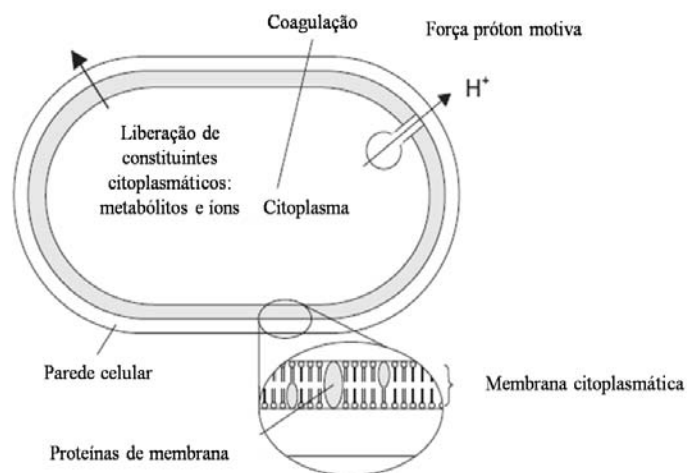


Figura 1 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana
 Fonte: Adaptado de Burt (2004)

Bakkali, Averbeck e Idaomar (2008), Gill e Holley (2006) e Lambert et al. (2001) corroboram os resultados obtidos por Burt (2004) ao afirmarem que a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de metabólitos e íons, como potássio e fosfato, levando, assim, a danos estruturais à membrana citoplasmática, comprometendo suas funções como barreira seletiva, local de ação enzimática e geração de energia.

2.1.1 Biossíntese dos óleos essenciais

O metabolismo dos seres vivos origina metabólitos primários e secundários; enquanto os primários são secretados e essenciais a todos os organismos, os secundários são produzidos apenas por alguns, em sua maioria, vegetais. Estes metabólitos secundários garantem vantagens a estes vegetais,

como na sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema como, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios ultravioleta (UV), atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (CASTRO et al., 2006; SANTOS, 2007).

A origem de todos esses metabólitos pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 2). O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose -4- fosfato, e origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, considerados responsáveis pelo desenvolvimento do sabor. Os fenilpropanoides são exemplos de compostos aromáticos formados a partir da ação da enzima fenilalanina amonialise (PAL) sobre a fenilalanina (FRANCO, 2003; SANTOS, 2007).

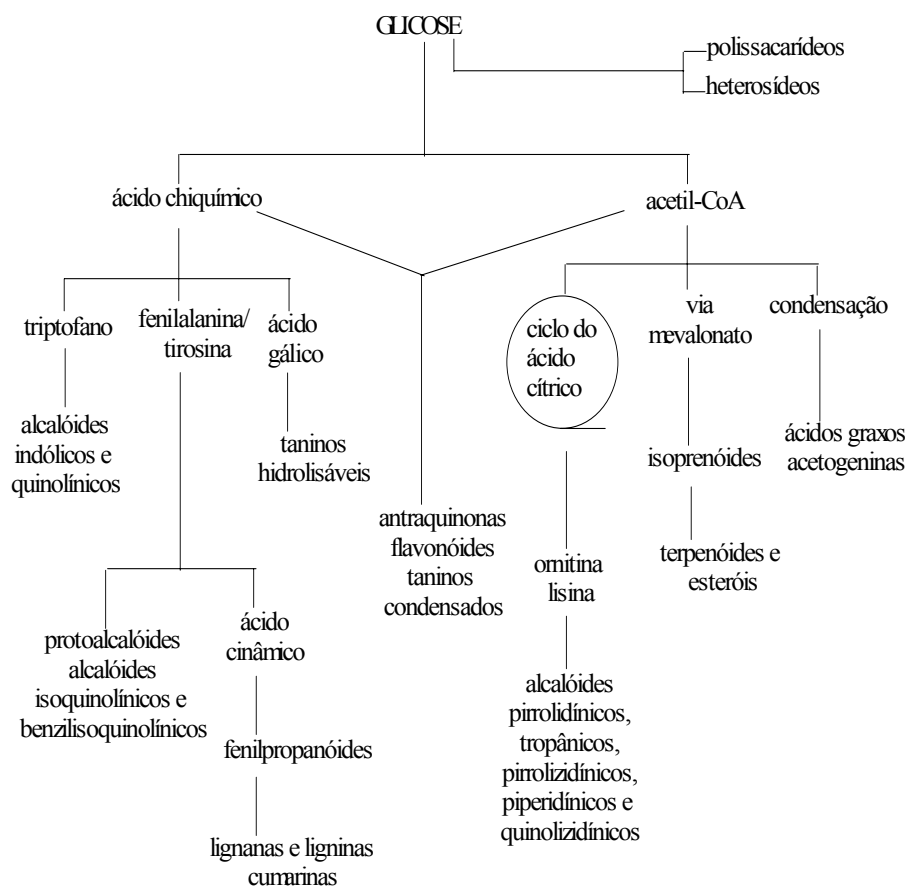


Figura 2 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários
 Fonte: Adaptado de Simões et al. (2007)

Já o acetato fornece as unidades acetila que compõem o intermediário reativo, acetil-CoA, precursor de vários compostos como os terpenos. Na biossíntese de terpenos, forma-se, inicialmente, o mevalonato, a partir da condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Este é convertido a isopentenil-pirofosfato (IPP), ou isopreno reativo. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco unidades de carbono. A molécula de IPP e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) formam *trans*-geranyl-pirofosfato (GPP), a partir do qual se formam todos os terpenos, tendo como monômero básico o isopreno (2-metil-1,3butadieno) (Figura 3). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15) (SANTOS, 2007).

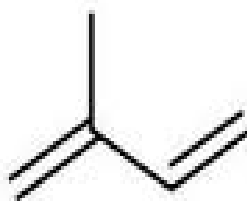


Figura 3 Estrutura química do isopreno

Além dos principais compostos de origem terpênicos, especificamente monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), outros compostos podem fazer parte da composição química dos óleos essenciais, como, por exemplo, alguns diterpenos (C20) e outros compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos alifáticos (lineares, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, alcoóis, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e, excepcionalmente,

compostos nitrogenados e sulfurados, cumarinas e homólogos de fenilpropanóides (DORMAN; DEANS, 2000; SIMÕES et al., 2007).

Há, ainda, uma rota pouco conhecida para a biossíntese de terpenos, a via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). De acordo com Wanke, Skorupupinska-tudek e Swiezewska (2001), nesta rota, o piruvato e o D-gliceraldeído-3-fosfato, produzidos pelo metabolismo primário, formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato que, após sucessivas reações, origina tanto IPP como DMAPP. Esta via ocorre nos cloroplastos, diferentemente da via do mevalonato, que ocorre no citoplasma celular (Figura 4).

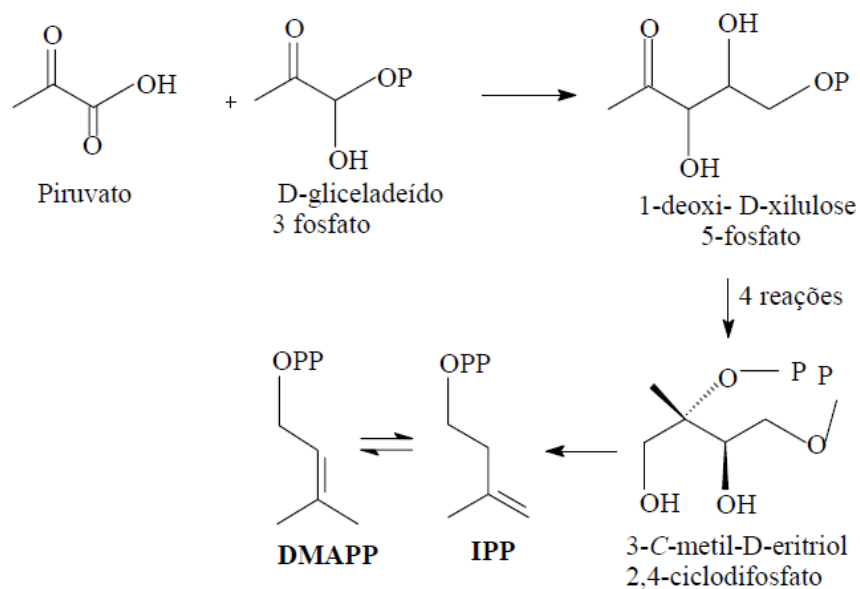


Figura 4 Biossíntese de terpenos via DXPS
 Fonte: Dewick (2002)

2.1.2 Aplicações dos óleos essenciais

Estima-se que sejam conhecidos óleos essenciais de aproximadamente 3.000 plantas, mas, destes, são comercializados em torno de 300 atualmente, sendo destinados, principalmente, às indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e à agricultura (NEDOROSTOVA et al., 2009). De acordo com a base de dados americana United Nations Commodity Trade Statistics Database (COMTRADE), apresentada por Bizzo, Hovell e Rezende (2009), os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo são EUA (40%) e União Europeia (30%), sendo a França o país líder em importações, seguido do Japão (7%), ao lado do Reino Unido, Alemanha, Suíça, Irlanda, China, Cingapura e Espanha. O mercado mundial de óleos essenciais gira em torno de US\$ 15 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% ao ano.

Os óleos essenciais têm atraído a atenção de pesquisadores de várias áreas, devido ao potencial antioxidante, antimicrobiano, flavorizante, aromático, anti-séptico, antiespasmódico e expectorante, entre outros. Por serem considerados seguros, os óleos essenciais tem sido utilizado em alimentos, para melhorar o aroma, o sabor e, ainda, por sua capacidade antimicrobiana (JAKIEMIU, 2008). 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. Esta característica torna as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, o que vem sendo largamente estudado na área da agricultura, pois estes apresentam notáveis atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas (SAITO; SCRAMIN, 2000).

Recentemente, a atividade antimicrobiana de óleos essenciais vem sendo avaliada frente a biofilmes microbianos, visando à possível utilização desses compostos como agentes sanificantes na indústria de alimentos. Os resultados encontrados nos trabalhos já realizados são promissores, entretanto, ainda

divergem entre si, demonstrando a necessidade de realização de mais estudos sobre o assunto (CHORIANOPOULOS et al., 2008).

2.2 Descrição botânica dos espécimes

2.2.1 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

O tomilho (*T. vulgaris*) é uma planta da família *Lamiaceae*, a qual compreende 150 gêneros, com cerca de 2.800 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo, principalmente Espanha, Itália, França e Grécia (PORTE; GODOY, 2001). É uma planta semiarbusciva, de ciclo perene, que atinge até 50 cm de altura, formando touceiras durante o desenvolvimento com caules lenhosos, rasteiros e tortuosos. As folhas são pequenas, opostas, sésseis, de formato linear-lanceolado ou oblongo e com bordos enrolados para baixo. As flores são pequenas, de coloração rosada e branca e agrupadas em inflorescência, em formato tipo espiga (Figura 5) (NAGRES, 2003).



Figura 5 Aspecto geral do tomilho (*T. vulgaris*)

Fonte: www.google.com.br/imagens

O cultivo do tomilho não demanda muitas exigências. Esta espécie prefere regiões secas, áridas, expostas ao sol e solos arenosos, mas leves e, possivelmente, calcáricos; é planta de solos pobres, rústica, evitando umidade e terras compactadas. O tomilho apresenta aroma herbáceo e sabor levemente picante, sendo este condimento de grande uso na culinária brasileira. Na França, o óleo essencial dessa planta vem sendo utilizado em restaurantes por chefes de cozinha para aromatizar pratos à base de aves e peixes (CASTRO; CHEMALE, 1995).

O óleo essencial de tomilho tem atividades antimicrobianas, principalmente contra bactérias e fungos. Essa atividade é atribuída ao timol e ao carvacrol, componentes fenólicos do óleo, sendo o timol o mais potente (Figura 6). As atividades antifúngicas, pesticidas e antibacterianas do óleo essencial de tomilho foram demonstradas por diversos pesquisadores (BAGAMBOULA; UYTENDAELE; DEBEVERE, 2004; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000; KALEMBA; KUNICKA, 2003).

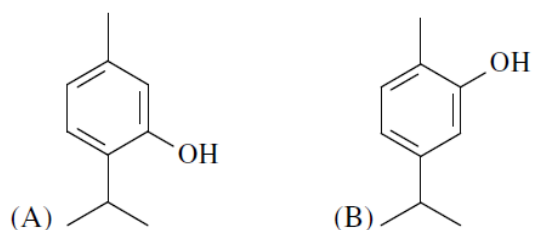


Figura 6 Estruturas químicas do timol (A) e Carvacrol (B)

Em estudos do óleo essencial de flores e folhas do tomilho (*T. vulgaris*), por meio de cromatografia em fase gasosa, foi demonstrado que, além dos compostos majoritários timol e carvacrol, este óleo apresenta p-cimeno, γ -terpineno, linalol, além de outros compostos terpênicos, sesquiterpenos e outros

hidrocarbonetos alifáticos (GUILLÉN; MANZANOS, 1998). Outros compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, já foram encontrados em extratos dessas plantas, responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e anti-inflamatórias (SHAN, 2002).

2.2.2 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

A espécie *S. aromaticum* pertence à família *Myrtaceae*, nativa das ilhas Moluca (arquipélago do norte da Indonésia), disseminada pelos alemães durante a colonização para outras ilhas do arquipélago, assim como para outros países. Atualmente, Madagascar e Indonésia são os principais produtores de cravo-da-índia. No Brasil, a planta é conhecida como craveiro, craveiro-da-índia e cravo. O craveiro é uma planta arbórea, perene e atinge 10 metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são ovais, persistentes e de coloração verde brilhante. As flores brancas são agrupadas em inflorescência do tipo cacho e seus botões são colhidos quando sua cor muda de verde para carmim, sendo cuidadosamente dessecados ao sol. O fruto é do tipo baga e de formato alongado (Figura 7). Desenvolvem-se em regiões de clima tropical e a propagação é feita por sementes, que preferem solos ricos em matéria orgânica e nutrientes, úmidos e bem drenados (NAGRAES, 2003).

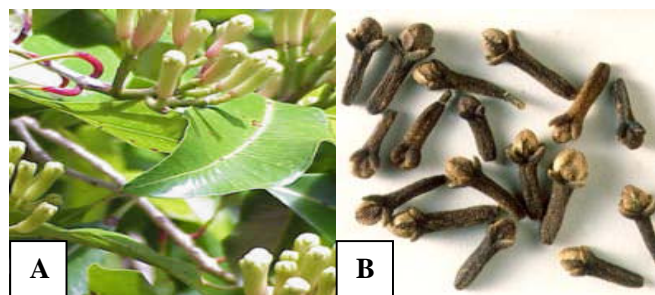


Figura 7 Aspecto geral do craveiro (*S. aromaticum*) (A) e o cravo seco (B)
Fonte: www.google.com.br/imagens

O cravo-da-índia seco é usado principalmente como condimento na culinária, devido ao seu marcante aroma e sabor, conferido por um composto fenólico volátil, o eugenol (Figura 8). Nas folhas ele chega a representar aproximadamente 95% do óleo extraído (RAINHA et al., 2001) e no cravo também é o principal componente do óleo, variando de 70% a 85% (BROWN; MORRA, 1995). Outros componentes dessa fração são acetato de eugenila (15%) e β -cariofileno (5% a 12%) que, juntos com eugenol, somam 99% do óleo.

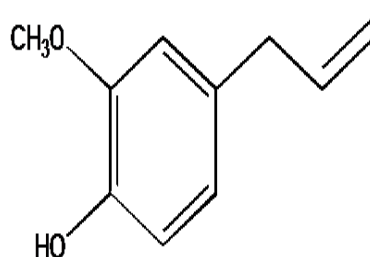


Figura 8 Estrutura química do eugenol

O eugenol é muito usado na odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal, tendo comprovado efeito bactericida (CHONG; FORD; KARIYAWASAM, 1997; KAPLAN et al., 1999). Em alguns trabalhos foi mostrado que eugenol ou extratos de *S. aromaticum* apresentam atividade nematocida, inseticida, antiviral, bactericida e fungicida (DELESPAUL et al., 2000; DORMAN; DEANS, 2000; NASCIMENTO et al., 2000; TSAO; YU, 2000). Além disso, o eugenol tem sido empregado para a produção de outros fenólicos, tal como a vanilina (PRIEFERT; RABENHORST; STEINBUCHER, 2001).

2.3 Biofilmes microbianos

Superfícies de equipamentos ou de utensílios que entram em contato com os alimentos durante o processo de industrialização não devem aumentar a incidência de microrganismos alteradores ou patogênicos no produto final. No entanto, sabe-se que, sob determinadas condições, os microrganismos podem se depositar, aderir e interagir com as superfícies, iniciando, assim, o crescimento celular. A multiplicação celular pode promover a formação de uma massa suficientemente grande para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, formando-se, assim, os biofilmes.

Na natureza, as bactérias ocorrem predominantemente na forma de biofilmes (VEENING et al., 2006). Um biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície, produzindo substâncias poliméricas extracelulares e interagindo uns com os outros (LINDSAY; HOLY, 2006). Uma importante característica da formação de biofilmes é a dependência crítica da presença das substâncias extracelulares que constituem a matriz polimérica, na qual as células são envoltas (VEENING et al., 2006).

Os biofilmes podem ser formados por todos os tipos de microrganismos deteriorantes ou patogênicos. Algumas bactérias possuem uma tendência maior para formá-los. Entre elas, as mais comuns são as dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* e *Bacillus*. Estes biofilmes podem ser formados em uma grande variedade de superfícies, bióticas e abióticas, nas quais nutrientes estejam disponíveis (LINDSAY; HOLY, 2006).

Harrison et al. (2005) e Nikolaev e Plakunov (2007) definem biofilme como uma comunidade de células bacterianas irregularmente estruturada, aderida a uma superfície envolvida em uma matriz de substância polimérica extracelular. Para se considerar que células aderidas constituem um biofilme, Andrade, Bridgeman e Zottola (1998) sugerem que seja necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , enquanto Ronner e Wong (1993) e Wirtanen, Husmark e Mattila-Sandholm (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , respectivamente.

A formação de biofilmes produz um ambiente dinâmico, no qual células microbianas se encontram em estado de homeostase, organizadas de maneira a utilizar todos os nutrientes disponíveis (SUTHERLAND, 2001). Biofilmes microbianos podem existir como agregados mais ou menos confluentes, em camadas únicas ou arquitetadas tridimensionalmente (STOODLEY et al., 2002). Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem fluxo de líquido e gases, dispersão de nutrientes e descarte de componentes (LINDSAY; NTOAMPE; GRAY, 2008; MCLANDBOROUGH et al., 2006; STOODLEY et al., 2002).

Inicialmente, a formação do biofilme é caracterizada por uma etapa reversível, na qual ocorre apenas a aderência da bactéria à superfície, seguida da aderência irreversível, reprodução celular e continuidade da aderência e, finalmente, a produção do glicocálix (CISTON; LUEPTOW; GRAY, 2008) (Figura 9). A formação é governada, em parte, por fatores físico-químicos, tais

como hidrofobicidade, forças de van der Waals, características ácido-básicas e propriedades elétricas, enquanto o seu desenvolvimento depende da linhagem e das condições ambientais (pH, composição do meio de crescimento e temperatura, bem como das propriedades da superfície) (GIANOTTI et al., 2008).

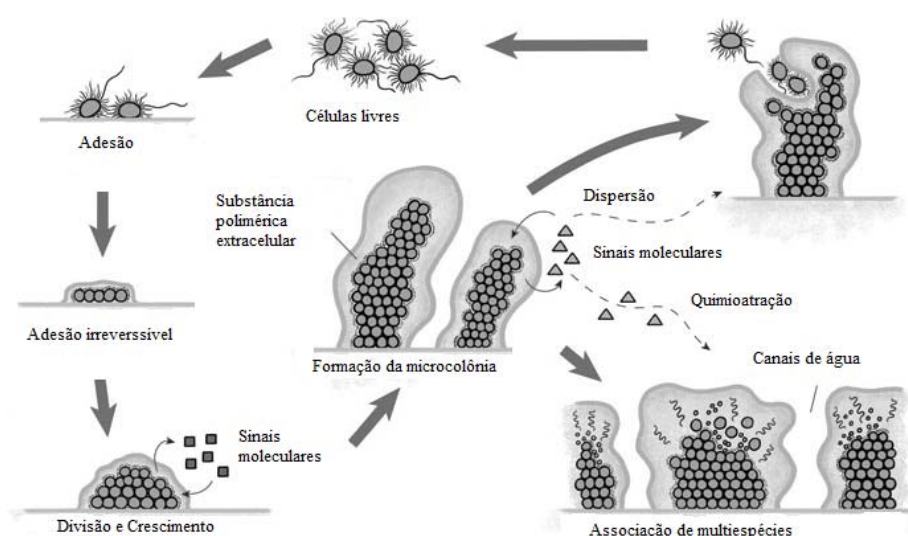


Figura 9 Etapas de formação do biofilme
Fonte: Adaptado de Harrison et al. (2005)

Segundo Kumar e Anand (1998), o biofilme pode ser desenvolvido em praticamente todo tipo de superfície e em qualquer meio ambiente no qual os microrganismos viáveis estão presentes. Para isso, deve ser estabelecido o que se chama condicionamento da superfície. Assim, substâncias orgânicas e inorgânicas provenientes do alimento podem formar um filme condicionante na parede do equipamento. A acumulação de moléculas na interface do filme condicionante leva a uma alta concentração de nutrientes, quando comparada à fase fluída, o que resulta na formação do biofilme, que também depende da

associação competitiva de culturas no meio. É evidente que o microrganismo sempre adere a uma superfície condicionante. Portanto, a microtopografia da superfície de contato com o alimento é igualmente importante, já que essa superfície pode conter canais e fissuras nos quais a bactéria pode se fixar.

Dessa maneira, os microrganismos podem aderir ao aço inoxidável, ao alumínio, ao vidro, à borracha, ao teflon, ao náilon, à fórmica, ao polipropileno e ao ferro forjado (KUMAR; ANAND, 1998). As características macroscópicas, e particularmente as microscópicas das superfícies, são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos alteradores ou patogênicos (ANDRADE, 2004). A microtopografia da superfície pode dificultar os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições criam condições para abrigar as células.

A eliminação do biofilme, normalmente, requer o uso de detergentes alcalinos, ácidos e/ou iodóforos. No entanto, esses geram alguns efeitos adversos como corrosão, contaminação do produto, toxicidade e a rápida resistência de algumas espécies microbianas. Novas alternativas de produtos têm sido testadas e particular interesse tem sido focado na aplicação de óleos essenciais, como sendo uma alternativa segura e efetiva, quando comparados aos compostos químicos.

Knowles et al. (2005) confirmaram a capacidade de *Salmonella enterica*, em sinergismo com *Staphylococcus aureus*, formar biofilme em superfície de aço inoxidável. Dados revelaram que *S. aureus* (7 a 8 log UFC/cm²) predominou no biofilme, mas a população de *S. enterica* (6 log UFC/cm²) foi significativa. A solução de carvacrol (que é um componente de óleo essencial de algumas plantas), ao fluxo de 1,0 mmol/h (carvacrol + Tween 80), reduziu significativamente o biofilme formado na primeira semana, sendo que para *S. aureus* a redução foi de 3,2 log UFC/cm² e 2,0 log UFC/cm² para *S. enterica*,

quando comparado ao controle. Segundo os autores, o carvacrol teve efeito inibitório no biofilme em vários estágios de maturação.

2.3.1 Biofilmes na indústria

A formação de biofilmes microbianos na indústria de alimentos é indesejável sob diversos aspectos, pois as bactérias que chegam a formar esses biofilmes são mais difíceis de serem eliminadas quando comparadas às suas células planctônicas. Uma vez estabelecido, o biofilme pode atuar como fonte de contaminação para produtos processados e outras superfícies (SHARMA; ANAND, 2002). Além disso, os biofilmes microbianos podem entupir tubulações, atrasar o tempo de processamento nas plantas, causar a corrosão do aço inoxidável e resultar em uma transferência de calor reduzida em trocadores de calor de placas. As pesquisas envolvendo biofilmes na indústria de alimentos, principalmente a de laticínios, tem se concentrado em espécies de *Pseudomonas* e em patógenos de origem alimentar, como *Staphylococcus aureus* (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2003).

Várias técnicas estão sendo adotadas para o estudo do biofilme e a determinação de estratégias preventivas e de controle é essencial. As mais utilizadas são a higienização adequada de equipamentos, a escolha e o uso correto de detergentes e agentes sanificantes (KUMAR; ANAND, 1998). De acordo com Arcuri (2000), um biofilme presente numa superfície com resíduos de alimentos impede a efetiva penetração do sanificante, não ocorrendo a eliminação ou a redução efetiva dos microrganismos, tornando-se, assim, um risco para a contaminação dos alimentos.

Segundo Oliveira et al. (2006), a ocorrência de biofilme não representa somente problemas na indústria de alimentos. Há casos em que há aplicabilidade do biofilme, como, por exemplo, nas indústrias que produzem alimentos

fermentados, em que os biofilmes formados por bactérias produtoras de ácido acético em biorreatores são responsáveis pela conversão de diversos substratos em vinagre. Além disso, os biofilmes são utilizados em tratamentos anaeróbios e aeróbios de efluentes domésticos e industriais e no processo de tratamento de água potável, removendo nitrogênio e carbono biodegradável (GILBERT; MCBAIN; RICKARD, 2003).

2.3.2 Superfícies envolvidas na formação do biofilme

As características macroscópicas e, particularmente, as microscópicas das superfícies são determinantes na maior ou menor adesão microbiana, com reflexos diretos na contaminação dos alimentos (ANDRADE, 2004). A microtopografia da superfície pode dificultar os procedimentos de limpeza, quando fendas e outras imperfeições criam condições para abrigar as células. Grande diversidade de microrganismos é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas, tais como o aço inoxidável e o polipropileno.

O aço inoxidável AISI 304 é o material mais frequentemente utilizado na indústria de alimentos, devido, principalmente, às suas propriedades de resistência à corrosão, além de ser quimicamente e fisiologicamente estável sob diversas temperaturas e de fácil limpeza (CASTRO; SALES; GONZALEZ, 2007; DAGBERT; MEYHEUC; BELLON-FONTAINE, 2006; PENG; TSAI; CHOU, 2001). Este material também apresenta maior resistência a agentes oxidantes e a outros agentes sanitizantes, como o ácido peracético, hipocloritos e iodóforos (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Por outro lado, é vulnerável à corrosão localizada, por íons clorados e componentes sulfurosos reduzidos, além de apresentar um alto custo (ISMAIL et al., 1999; PENG; TSAI; CHOU, 2001).

O polipropileno, por sua vez, também é um material resistente, mas com a principal vantagem de ser de baixo custo. Este material tem se tornado cada

vez mais frequente nas indústrias de alimentos, sendo o constituinte de revestimentos de tanques, acessórios, utensílios e superfícies de cortes. Devido a isso, o estudo das possibilidades de contaminação cruzada entre superfícies e alimentos, a determinação da taxa de adesão bacteriana e a formação de biofilmes neste tipo de material é muito importante (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000).

Segundo Meyer (2003), na classificação de diversos materiais quanto ao favorecimento da formação de biofilmes, o vidro aparece como material que menos favorece a adesão microbiana, seguido de aço inoxidável, polipropileno, PVC, entre outros. Porém, ainda segundo o autor, esta classificação deve ser interpretada com cautela, uma vez que os resultados podem variar conforme a espécie bacteriana em estudo e quanto às condições de realização do teste.

2.4 Características gerais do *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria mesófila gram-positiva, aeróbia ou anaeróbia facultativa. Este microrganismo cresce em ampla faixa de pH, com crescimento ótimo próximo da neutralidade e, em relação à atividade de água, o desenvolvimento está na faixa de 0,83 a 0,99, sendo possível crescer em uma variedade de alimentos. São também tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna os alimentos curados veículos potenciais para o desenvolvimento dessa bactéria (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Além disso, o *S. aureus* tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares, como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência, sendo também empregadas para a sua identificação entre outras espécies de estafilococos (MADANI, 1998).

O *S. aureus* é um microrganismo constituinte da microbiota humana e a contaminação ocorre, principalmente, por fonte humana, animal ou ambiental.

Em alimentos, a presença do *S. aureus* pode indicar contaminação pela pele, boca, fossas nasais dos manipuladores do alimento, introduzidos diretamente por lesões infectadas nas mãos e braços ou por tosse e espirros, comuns nas infecções respiratórias.

O contato com superfícies inadequadamente higienizadas dos equipamentos de produção ou a exposição do produto alimentício também podem ser fonte de contaminação por *S. aureus*. Portanto, sua presença em linhas de processamento de alimentos tem sido considerada como um indicador de condições precárias de higiene e manipulação inadequada da matéria-prima ou do produto final.

O *S. aureus*, apesar de não sobreviver aos tratamentos térmicos, é um conhecido produtor de enterotoxinas termoestáveis causadoras de toxinfecções alimentares. Os sintomas decorrentes de intoxicações costumam aparecer poucas horas após a ingestão e são caracterizados por náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia sem febre (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). Podem ocorrer também dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febres, quando a quantidade de toxina for elevada. Quando há choque e desidratação, é necessária a hospitalização para a reposição de fluidos e eletrólitos.

Em muitos países da Europa, nos Estados Unidos e no Canadá, o *S. aureus* é o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (MEYRAND; VERNOSY-ROZAND, 1999). Na França, a toxiose alimentar provocada por *S. aureus* é a segunda mais frequente causadora de surtos de doenças alimentares relacionada a produtos lácteos, atrás apenas da *Salmonella* (ROSEC; GIGAUD, 2002).

A importância do *S. aureus*, no que diz respeito à sua capacidade de formação de biofilme, tem sido relatada em vários trabalhos (HERRERA et al., 2007; OULAHAL et al., 2008; RODE et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

O presente estudo foi desenvolvido em laboratórios da Universidade Federal de Lavras. A extração do óleo essencial de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) foi realizada no Laboratório de Química Orgânica e a caracterização e identificação dos compostos químicos dos óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) e tomilho (*T. vulgaris*) foram realizadas no Laboratório de Análise e Prospecção Química, no Departamento de Química.

A curva de crescimento do microrganismo testado (*S. aureus*), bem como a determinação da atividade antimicrobiana, por meio das concentrações mínimas inibitórias (CMI) e a avaliação da capacidade desses óleos essenciais em reduzir os biofilmes formados sobre a superfície de aço e polipropileno, foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos.

As eletromicrografias da estrutura dos biofilmes maduros e sanificados foram obtidas a partir de microscópio eletrônico de varredura, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia.

3.2 Obtenção dos óleos essenciais

O óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) foi extraído a partir da matéria vegetal seca deste, adquirida no Mercado Municipal de Diamantina, em Diamantina, MG.

O processo de extração do óleo essencial foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado (Figura

10), adaptado a balão de fundo redondo e boca esmerilada. O espécime vegetal, imerso em água, foi submetido a aquecimento e mantido sob ebulição pelo período de 2 horas. Posteriormente, coletou-se o hidrolato (água + óleo), que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36Xg, por 5 minutos, visando à separação da fase orgânica da fase aquosa. O óleo essencial foi armazenado em frasco de vidro estéril e submetido à remoção de possíveis resíduos de água por meio de pistola de secagem. O frasco contendo o óleo foi envolto com papel alumínio para proteção da luz e acondicionado, sob temperatura de refrigeração (7°C), durante toda a execução do experimento (GUIMARÃES et al., 2008).



Figura 10 Aparelho de Clevenger modificado, utilizado na extração do óleo essencial de cravo-da-índia (*S. aromaticum*)

O óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*) foi adquirido da empresa Ferquima (Figura 11).



Figura 11 Frasco óleo essencial de tomilho (*T. vulgaris*) comercializado no Brasil pela empresa Ferquima

3.2.1 Identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais

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

Os compostos foram identificados por comparações com espectros existentes nas bibliotecas WILEY, 8 lib e FENSC, 1.2 lib.

3.3 Microrganismo e preparação do inóculo

3.3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A cultura faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.3.2 Manutenção e padronização da cultura

A cultura de *S. aureus* foi mantida a -18°C , em microtubos contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), NaCl (5g), H_2O (1.000 mL) pH $7,2\pm 7,4$]. Durante o experimento, foram realizadas repicagens para a manutenção das culturas. Aliquotas foram transferidas dos microtubos para tubos, contendo caldo triptona de soja (*Tryptic Soy Broth*) e incubadas, a $37^{\circ}\text{C}/24$ horas. Após o cultivo, 1 mL da cultura foi dispensado em microtubos estéreis e centrifugado, a $6.000 \times g$, durante 8 minutos, em microcentrífuga (Eppendorf). Retirado o sobrenadante, o conteúdo foi novamente recoberto com meio de congelamento e acondicionado a -18°C .

Para a reativação e a utilização da cepa, foram inoculados 10 μL da cultura em tubos contendo 3 mL de TSB e incubados a $37^{\circ}\text{C}/24$ horas. Após a incubação, foram retirados 20 μL do inóculo e transferidos para 200 mL de TSB. O número de células por mL foi quantificado utilizando-se uma curva padrão, sendo o crescimento monitorado por espectrometria a 600 nm e feita contagem em placas. A cultura bacteriana foi padronizada para a concentração de cerca de 10^8 UFC/mL.

3.3.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais

A metodologia empregada para a determinação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais e da concentração mínima inibitória (CMI) foi a de difusão em disco (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2000), na qual meio ágar tripton de soja (*triptic soy agar*) foi inoculado com 10^8 UFC/mL, e depositado em placas de Petri estéreis com diâmetro de 140 mm. Após a solidificação, discos de papel filtro estéreis, com 6 mm de diâmetro, foram posicionados sobre o meio.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*S. aromaticum*) e tomilho (*T. vulgaris*) foram diluídos em etanol, obtendo-se as concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20; 0,10% v/v e 5 μ L de cada concentração foram depositados sobre os discos de papel. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C/24 horas. Posteriormente, com o auxílio de paquímetro, foi aferido o diâmetro (mm) dos halos inibitórios formados e determinada a concentração mínima inibitória (CMI). A menor concentração em que se formou este halo de inibição foi definida como a CMI.

3.4 Formação do biofilme bacteriano em superfície de aço inoxidável e polipropileno

3.4.1 Higienização dos cupons

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

Os cupons de aço inoxidável AISI 304 foram limpos individualmente com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a

higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada estéril, secos por 2 horas, em estufa, a 60°C e autoclavados a 121°C/15 minutos. (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). Já os cupons de polipropileno, inicialmente, foram imersos em solução comercial de ácido peracético (0,3% v/v) sob agitação orbital de 50 rpm a 50°C/30 minutos. Em seguida, foram imersos em água destilada estéril, à temperatura de 80°C/5 minutos. Após este período foram retirados e imersos em água destilada estéril a temperatura ambiente, mantidos sob agitação de 50 rpm, por 1 minuto. Os cupons foram secos em estufa a 40°C, por 2 horas e autoclavados, por 15 minutos, a 115°C (OULAHAL et al., 2007).

3.4.2 Adesão das células bacterianas

Em duas placas de Petri (140 mm de diâmetro) foram adicionados 45 cupons de aço inoxidável AISI 304, 80 mL de TSB e inoculados 10^8 UFC/mL da cultura. Em outras duas placas de Petri, foram empregados os mesmos procedimentos, entretanto, com 45 cupons de polipropileno, com o objetivo de promover a formação do biofilme nestas superfícies. As placas contendo o inóculo foram incubadas a 37°C, sob agitação orbital de 50 rpm. Em intervalos de 48 horas, os cupons foram coletados, lavados com água peptonada (0,1% m/v) por 5 vezes e imersos em de TSB estéril contidos em placas esterilizadas. Esse procedimento foi realizado por cinco vezes, visando à formação completa do biofilme após 10 dias de incubação (JOSEPH et al., 2001).

3.4.3 Enumeração das células aderidas

Para enumerar as células aderidas, a cada dois dias de incubação foram retirados um cupom de aço inoxidável AISI 304 e um de polipropileno, de cada placa de Petri. Estes foram lavados com água peptonada (0,1% m/v) por cinco

vezes, para a eliminação de células planctônicas e as células sésseis foram coletadas utilizando-se swab de algodão padronizado esterilizado. Os swabs foram transferidos para tubos contendo água peptonada (0,1% m/v), sendo, em seguida, agitados em vórtex, por 2 minutos. Após esse procedimento, realizou-se diluição seriada, sendo tomadas alíquotas de 0,1 mL e o número de células viáveis quantificadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas e o resultado expresso em UFC/cm² (JOSEPH et al., 2001).

3.5 Preparo das soluções sanificantes

Para a realização do teste de sensibilidade das células sésseis, foram formuladas quatro soluções sanificantes contendo solução salina (NaCl 0,85% m/v), etanol (P.A 95% v/v) e óleo essencial, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 Composição das soluções sanificantes

Soluções sanificantes	Composição (mL)		
	Solução salina	Etanol	Óleo essencial
Controle	8,00	2,00	0,00
<i>S. aromaticum</i>	8,00	1,99	0,01
<i>T. vulgaris</i>	8,00	1,99	0,01
Combinação*	8,00	1,99	0,005

*Combinação dos óleos *S. aromaticum* e *T. vulgaris* na proporção 1:1

Todas as soluções sanificantes continham um volume total de 10 mL e as quantidades de óleos essenciais utilizadas na formulação das soluções sanificantes foram definidas a partir dos resultados do teste de CMI, previamente realizado por meio do método de difusão em disco citado anteriormente.

3.6 Tratamento dos biofilmes com soluções sanificantes contendo óleos essenciais em diferentes tempos de contato

No décimo dia de cultivo, cupons de aço inoxidável e polipropileno foram retirados de cada placa de Petri, lavados em água peptonada 0,1% (m/v) por 5 vezes, para a eliminação de células não aderidas, e imersos nas soluções sanificantes (Tabela 1), por 5 e 10 minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de sanificação, foi realizado esfregão sobre os cupons, com auxílio de um swab de algodão padronizado esterilizado. Os swabs foram transferidos para tubos contendo água peptonada 0,1% (m/v), sendo, em seguida, agitados em vórtex, por 2 minutos. Após esse procedimento, realizou-se diluição seriada e alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas contendo TSA para a determinação do número de células viáveis determinadas em meio TSA. Empregou-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37°C/24 horas, sendo realizada, ao final deste período, a contagem padrão em placas e o resultado expresso em UFC/cm² (JOSEPH et al., 2001).

3.7 Visualização das superfícies dos cupons por microscopia eletrônica de varredura

Os cupons de aço inoxidável e polipropileno contendo biofilme e sanificados foram imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado), pH 7,2, por 48 horas. Após este período, os cupons foram lavados por imersão, por 10 minutos, em tampão cacodilato, por três vezes e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, em água, por 3 horas. Após este período, foram lavados por três vezes em água destilada e, em seguida, desidratados em gradiente de etanol (25%, 50%, 70%, 90%, 95% por 10 minutos e 100%, por três vezes de 10 minutos). Em seguida, o material foi levado ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) para a realização da secagem e, posteriormente, a montagem em stubs e a cobertura com fina camada de ouro (metalizador Bal-Tec SCD 050). No final deste procedimento foram obtidas eletromicrografias da bactéria aderidas à superfície do aço inoxidável e polipropileno, antes e após os tratamentos nas soluções sanificantes, utilizando-se o microscópio eletrônico de varredura Evo 040 Leo (ALVES, 2004).

3.8 Delineamento experimental e análise estatística

Para a avaliação da atividade antibacteriana das diferentes concentrações dos óleos essenciais perante o microrganismo *S. aureus*, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (3x10) com 3 repetições, com o fator óleo essencial com 3 níveis: tomilho, cravo-da-índia e combinação e o fator concentração com 10 níveis quantitativos: 0,10% – 0,20% – 0,39% – 0,78% – 1,56% – 3,12% – 6,25% – 12,50% – 25,00% – 50,00%. Para a enumeração das células aderidas, nos cupons de aço inoxidável e polipropileno o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial

(2x5) com 3 repetições, com o fator superfície com 2 níveis: aço inoxidável e polipropileno e o fator tempo com 5 níveis quantitativos: 48, 96, 144, 192 e 240 horas. Finalmente, para a enumeração das células aderidas nos cupons de aço inoxidável e polipropileno após o tratamento destes com soluções sanificantes em diferentes tempos de contato, o delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (4x2x2) com 3 repetições, com o fator agentes com 4 níveis qualitativos: controle, cravo, tomilho e combinação; o fator superfícies com 2 níveis qualitativos: aço inoxidável e polipropileno e o fator tempo com 2 níveis quantitativos: 5 e 10 minutos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas SISVAR (FERREIRA, 2008) e R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

No óleo essencial de cravo-da-índia foram detectados, por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), quatro picos de compostos químicos, sendo possível identificar, por comparações com espectros existentes nas bibliotecas (WILEY, 8 lib) e (FENSC, 1.2 lib), somente o eugenol (Figura 12).

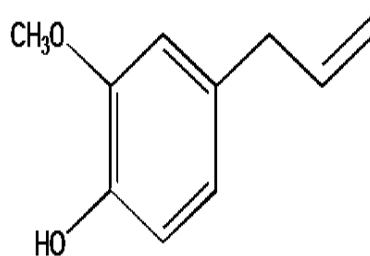


Figura 12 Estrutura química do Eugenol

Em avaliação realizada por Pereira et al. (2008), o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou, em sua constituição, 86,3% de eugenol, 8,2% de trans-cariofileno, 0,8% de α -humuleno e 3,6% de acetato de eugenila. Em outro estudo realizado por Oussalah et al. (2007), os constituintes foram encontrados nas seguintes proporções: 78% de eugenol e 8% de acetato de eugenila. Em estudo realizado por Mazzafera (2003), o óleo essencial de cravo-da-índia apresentou em sua constituição, aproximadamente, 75% de eugenol, 15% de acetato de eugenila e 10% de β -cariofileno. Posteriormente, Oliveira (2009), ao avaliar a composição do óleo essencial de botões florais de cravo-da-índia, verificou a presença de 88% de eugenol, 1% de β -cariofileno e 11% de acetato

de eugenila. Estes estudos supracitados identificaram o eugenol como principal constituinte do óleo essencial de cravo-da-índia, assim como também neste trabalho.

Da mesma forma que o óleo essencial de cravo-da-índia, o de tomilho não teve todos seus constituintes identificados. Porém, dos 15 picos observados no cromatograma obtido pela cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), foi possível identificar apenas seis, timol, carvacrol, 1,8 cineol, terpineno, borneol e mirceno (Figura 13).

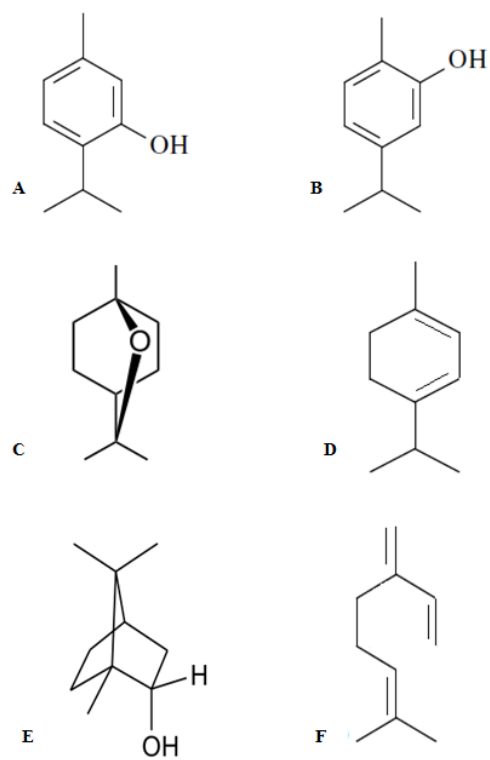


Figura 13 Estruturas químicas do timol (A), carvacrol (B), 1,8 cineol (C), terpineno (D), borneol (E) e mirceno (F)

Em estudo realizado por Tebaldi (2008) do óleo essencial de tomilho foram identificados os compostos químicos para-cimeno, terpineno e carvacrol como componentes majoritários. Sartoratto (2004), analisando também o óleo de tomilho, identificaram como componentes majoritários: timol (79,15%), carvacrol (4,63%) e para-cimeno (3,27%), sendo alguns, portanto, semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Neste contexto de estudos sobre a composição química dos óleos essenciais, vale salientar que os constituintes e suas concentrações relativas não dependem somente da espécie da planta. Entre os vários fatores que influenciam a composição química, os mais importantes são a origem da planta, a parte desta utilizada e as condições climáticas e de crescimento, como a temperatura, o tipo de solo e os fertilizantes empregados, e as condições de destilação e estocagem (OLADIMEJI et al., 2001).

4.2 Avaliação da concentração mínima inibitória (CMI)

Os óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e sua combinação promoveram níveis significativos de inibição de *S. aureus* nas diferentes concentrações testadas (Tabela 2).

Pode-se verificar que, ao se utilizar somente o diluente, ou seja, etanol (P.A 95% v/v) sem óleo essencial, não houve formação de halo inibitório, o que comprova que o diluente, no caso o etanol, não apresentou potencial antimicrobiano. A formação de halo inibitório sobre *S. aureus* foi observado nas concentrações testadas dos óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e sua combinação, o que evidencia a ação antimicrobiana destes (Figura 14). Verificase também que, em maiores concentrações dos óleos essenciais, houve formação de halos inibitórios maiores. Isso provavelmente ocorreu devido à maior concentração dos princípios ativos.

Tabela 2 Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais de tomilho, cravo-da-índia e sua combinação, frente ao *Staphylococcus aureus*

Concentrações % (v/v)	Óleos essenciais		
	<i>Tomilho</i>	<i>Cravo-da-índia</i>	<i>Combinação</i>
0,00	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
0,10	7,00±0,00 ^a	7,00±0,00 ^a	8,00±0,00 ^a
0,20	9,00±0,00 ^b	7,00±0,00 ^a	8,00±0,00 ^{ab}
0,39	10,00±0,00 ^b	7,33±0,57 ^a	9,00± 0,00 ^b
0,78	10,66±0,57 ^b	8,66±0,57 ^a	10,00±0,00 ^b
1,56	11,33±0,57 ^b	9,66±0,57 ^a	10,00±0,00 ^a
3,12	12,00±0,00 ^b	11,00±1,00 ^{ab}	10,33±0,57 ^a
6,25	12,33±0,57 ^b	12,00±0,00 ^{ab}	11,00±0,00 ^a
12,50	18,66±0,57 ^b	12,33±0,57 ^a	13,33±1,15 ^a
25,00	30,00±1,00 ^c	14,33±0,57 ^a	19,33±0,57 ^b
50,00	38,00±1,00 ^c	16,33±0,57 ^a	20,66±1,15 ^b

*Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição, em milímetros (mm) ± o desvio padrão, incluindo o diâmetro dos discos de papel (6mm). Médias seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

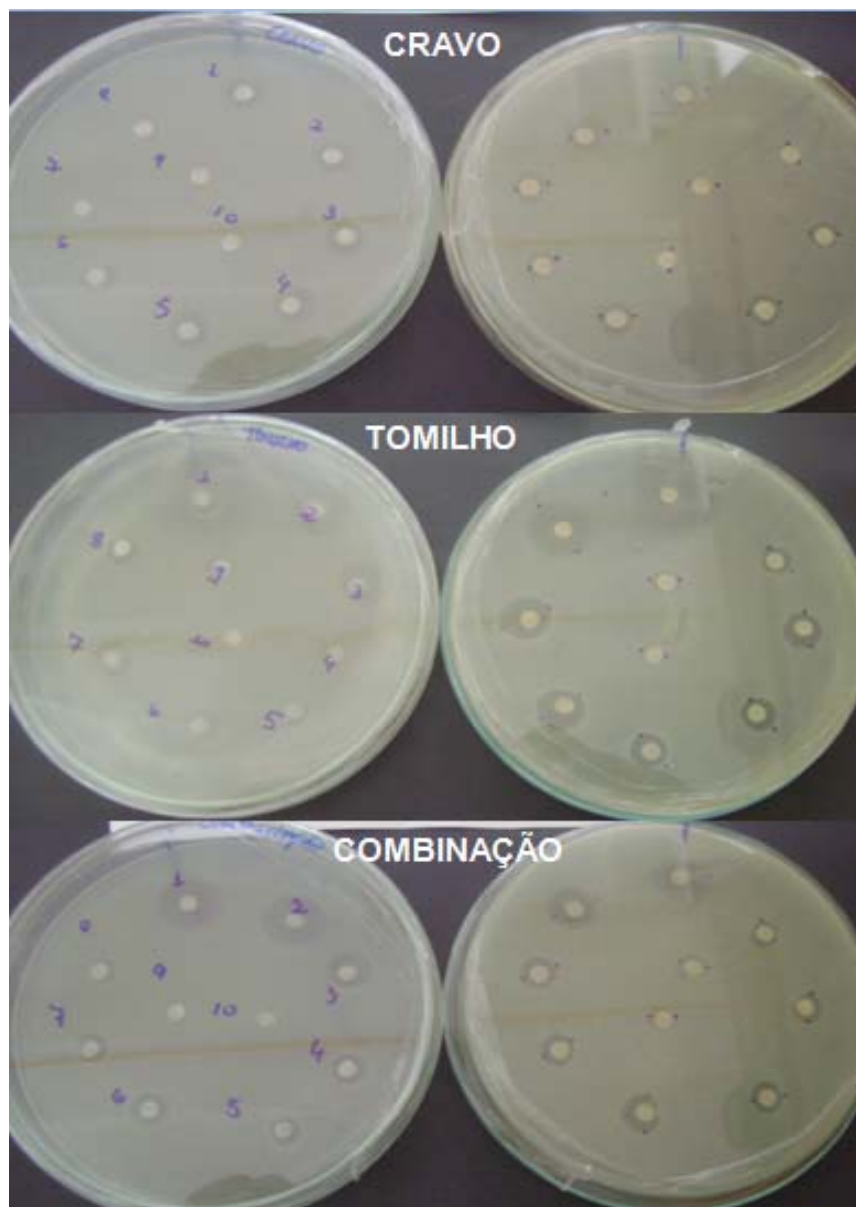


Figura 14 Halos de inibição obtidos pelo método de difusão em disco para os óleos essenciais de cravo-da-índia (A), tomilho (B) e sua combinação (C)

Os óleos essenciais de cravo-da-índia, tomilho e sua combinação apresentaram boa resposta antimicrobiana, ou seja, formação de halos inibitórios em baixas concentrações testadas, com CMI de 0,10% e sem diferença significativa entre o diâmetro dos halos inibitórios formados nesta concentração.

Farag et al. (1989), estudando a composição química de diferentes óleos essenciais industrializados, observaram que a atividade antimicrobiana dos óleos estavam predominantemente relacionados aos seus compostos majoritários, demonstrando, dessa forma, que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar relacionada à sua respectiva composição, além da configuração estrutural e grupos funcionais, bem como da possibilidade de interações sinérgicas entre os componentes (DORMAN; DEANS, 2000). No entanto, considerando o grande número de diferentes grupos químicos pertencentes aos óleos essenciais, a atividade antimicrobiana não pode ser atribuída a um mecanismo específico, mas sim a vários alvos de ação na célula microbiana (BURT, 2004).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia está relacionada à presença do composto majoritário eugenol, sendo este um composto fenólico. Diversas correlações entre a composição química dos compostos dos óleos essenciais e suas atividades antimicrobianas têm sido relatadas em vários estudos, contudo, na literatura define-se que estes óleos contendo compostos fenólicos como majoritários apresentam maiores atividades antimicrobianas, principalmente em bactérias gram-positivas, como é o caso do *S. aureus* (BURT, 2004; GRIFFIN et al., 1999). Di Pasqua et al. (2007) mostraram que timol, carvacrol e eugenol apresentaram elevada interação com a membrana citoplasmática de várias bactérias, promovendo alterações estruturais.

O óleo essencial de tomilho tem como constituintes majoritários o timol e o carvacrol, os quais são responsáveis pelo seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001; SARTORATTO, 2004; TEBALDI,

2008). O carvacrol e timol são compostos fenólicos que têm em comum um grupo hidroxila, ao qual é creditada a intensa atividade antimicrobiana deste óleo essencial (DORMAN; DEANS, 2000; ULTEE; KETS; SMID, 1999).

Em um experimento realizado paralelamente, foi avaliada a atividade antimicrobiana do eugenol e do carvacrol, nas concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%, 0,20% e 0,10% v/v, utilizando o mesmo isolado de *S. aureus* e metodologia para determinação da CMI. Estes compostos estão entre os principais constituintes dos óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho. O tamanho dos halos inibitórios formados pelo eugenol nas distintas concentrações foi bem similar ao tamanho dos halos formados a partir do óleo de cravo-da-índia, o que indica que, possivelmente, os constituintes minoritários deste óleo não interferem no aumento da ação antimicrobiana, ou seja, essa atividade é promovida basicamente pelo eugenol. Já em relação ao carvacrol, foi observado que o tamanho dos halos inibitórios formados foi menor em relação ao óleo de tomilho, o que indica que a presença de outros compostos é essencial na potencialização da atividade antimicrobiana deste óleo.

Segundo Milos, Mastelic e Lerkivic (2000), os componentes minoritários dos óleos essenciais também têm sua contribuição no desencadeamento dos fenômenos envolvidos na eficiência da atividade antimicrobiana. Assim, acredita-se que ocorra ação concomitante de vários compostos sobre diferentes alvos na célula microbiana (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

O mecanismo exato de ação de cada composto fenólico sobre as várias bactérias é difícil de ser determinado (BURT, 2004; KALEMBA; KUNICKA, 2003). Porém, acredita-se que os óleos essenciais interagem com vários componentes celulares e afetam diferentes processos metabólicos e fisiológicos, modificando a permeabilidade da membrana. Essa modificação de permeabilidade da membrana citoplasmática provoca ruptura do fluxo de

elétrons, perturbação do transporte ativo, inibição de atividade de enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático (BURT, 2004; COX, 2000; MOREIRA et al., 2005; PAPARELLA et al., 2008; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Pereira et al. (2008), utilizando a mesma cepa de *S. aureus* empregada nesse estudo, mostraram que a bactéria foi sensível ao óleo essencial de cravo-da-índia a partir de 0,10% de concentração mínima, o que também pode ser observado neste estudo.

Ao se tentar fazer comparações entre resultados de CMI de óleos essenciais é importante levar em consideração os vários fatores que influenciam os resultados obtidos. Pode-se citar, por exemplo, a variação da composição do óleo essencial devido à época de colheita da planta, a localização geográfica e o método de extração (MILOS; MASTELIC; LERKIVIC, 2000). Além desses fatores, a cepa utilizada e a metodologia empregada para avaliação da CMI também influenciam grandemente os resultados obtidos. Dessa forma, uma comparação de resultados é difícil de ser realizada (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Assim, a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* neste estudo teve por objetivo nortear as possíveis concentrações para a formulação de agentes sanificantes contendo estes óleos essenciais.

4.3 Formação do biofilme por *Staphylococcus aureus*

Na Tabela 3 são apresentadas as contagens de células sésseis obtidas das superfícies dos cupons de aço inoxidável AISI 304 e de polipropileno, durante o processo de formação do biofilme.

Tabela 3 Número de células sésseis (Log UFC/cm²) de *Staphylococcus aureus* quantificadas durante a formação do biofilme sobre as superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, com incubação a 37°C e utilizando meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato

Tempo (horas)	Aço inoxidável (Log UFC/cm²)	Polipropileno (Log UFC/cm²)
48	6,13±0,42 ^a	6,13±0,54 ^a
96	6,17±0,33 ^a	6,12±0,48 ^a
144	6,57±0,44 ^a	6,56±0,49 ^a
192	6,89±0,17 ^a	6,64±0,49 ^a
240	7,38±0,12 ^b	6,58±0,05 ^a

**Resultados expressos pela média ± o desvio padrão. Médias seguidas de diferentes letras na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Nota-se que as células microbianas aderiram de forma semelhante nas duas superfícies até 192 horas e se diferenciaram significativamente somente ao final do processo de formação do biofilme, ou seja, após 240 horas de incubação. As eletromicrografias na Figura 15 ilustram a adesão das células de *S. aureus* nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno.

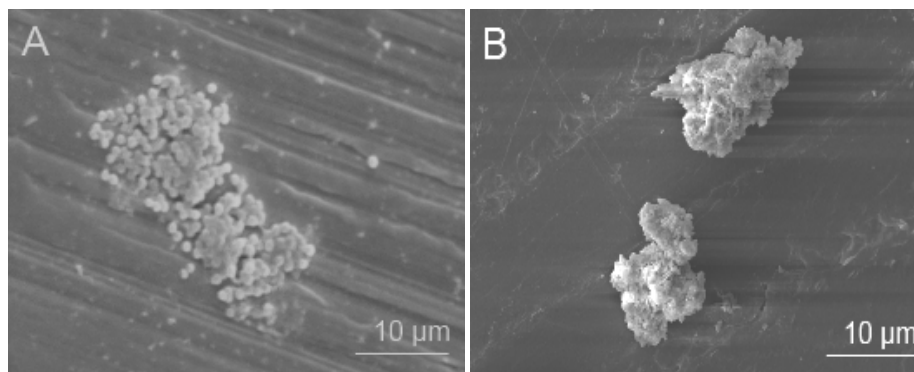


Figura 15 Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão do *Staphylococcus aureus*, após 240 horas de formação do biofilme, nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 (A) e polipropileno (B)

A adesão das células bacterianas depende de fatores como a fisiologia e a morfologia das células e as propriedades físico-químicas da superfície de contato. Os microrganismos gram-negativos apresentam maior facilidade de adesão em superfícies em comparação aos gram-positivos, pois estes apresentam pili, fimbrias e flagelos, bem como a membrana externa. Para microrganismos eletricamente carregados com cargas negativas, estes apresentam maior dificuldade de ligação direta às superfícies. A participação de filme condicionante, formado por diversos compostos e moléculas provenientes da fase aquosa, será determinante. O *S. aureus* é um microrganismo gram-positivo e que não apresenta membrana externa ou estruturas para a motilidade e tende a ser mais eletricamente carregado com cargas negativa, sendo, então, de extrema necessidade a participação de filme condicionante para a adesão destes às superfícies (BOARI et al., 2009; MEI et al., 2003).

Segundo informações disponíveis no sítio da American Iron and Steel Institute e da British Stainless Association, o aço inoxidável, descoberto por Harry Brearley, Inglaterra, 1912, corresponde a uma liga composta de ferro e cromo. Em se tratando do AISI 304, o mais utilizado na indústria de alimentos,

esta liga contém de 18% a 20% de cromo, 8,0% a 10,5% de níquel e o restante, de ferro.

Por um fenômeno denominado passivação, o cromo, devido à sua alta afinidade com o oxigênio, tende a se combinar com este, formando uma fina camada de óxido de cromo, com aproximados 40 Angstrom de espessura. Essa camada passiva é responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável. Neste contexto, em se tratando da adesão inicial, quanto mais hidrofóbica for a célula bacteriana, maior a sua capacidade de se ligar diretamente a esta superfície. Considerações semelhantes foram feitas por Meylheuc et al. (2006) e Sheng, Ting e Pehkonen (2007). Assim, superfícies consideradas hidrofóbicas, como aço inoxidável, permitem que a adesão ocorra mais facilmente do que em superfícies menos hidrofóbicas ou hidrofílicas, o que é evidenciado pelas contagens e eletromicrografias, que demonstram melhor adesão das células na superfície de aço inoxidável ao final de 240 horas de incubação em relação à superfície de polipropileno.

Em estudo realizado por Boari et al. (2009), que consistiu em avaliar a formação de biofilme em aço inoxidável por *Staphylococcus aureus* usando leite como substrato e diferentes condições de cultivo, observou-se, pelas eletromicrografias de varredura, a formação de biofilme pelo *S. aureus* em todas as condições de cultivo testadas, revelando a capacidade de adesão desta bactéria principalmente à superfície de aço inoxidável, o que também foi observado nas eletromicrografias deste estudo.

Em revisão realizada por Chmielewski e Frank (2003), foi demonstrado que uma camada de matéria orgânica sobre a superfície pode promover e facilitar a adesão bacteriana. Além disso, estes autores afirmam que o tempo de contato entre as células e as superfícies também exerce influência na adesão bacteriana. A adesão irreversível das células às superfícies ocorre entre 20 minutos e, no máximo, 4 horas de contato. Após este período, a remoção dessas

células requer a aplicação de força física, produtos químicos ou calor. Neste estudo é possível observar que as células bacterianas já obtiveram uma boa adesão nas superfícies de aço inoxidável e polipropileno a partir de 48 horas e aumentando em pequena proporção até 240 horas.

A probabilidade de permanência de células aderidas irreversivelmente após procedimentos de higienização é grande e corresponde a uma das principais razões da formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos, podendo se tornar uma fonte constante de contaminação.

4.4 Tratamento dos biofilmes com soluções sanificantes

Na Tabela 4 são apresentadas as contagens de células sésseis aderida aos cupons das superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais. Na Tabela 5 é apresentado o percentual de redução do número de células sésseis após o tratamento com as soluções sanificantes.

A efetividade das soluções sanificantes contendo óleos essenciais podem ser observadas pelas contagens obtidas após o tratamento dos cupons em ambas as superfícies e pelo percentual de redução destas células. Nota-se diferença significativa das contagens e no percentual de redução de células sésseis aderidas entre os distintos tratamentos. Todas as soluções sanificantes à base de óleos essenciais mostraram potencial antibacteriano superior ao da solução sanificante controle.

Tabela 4 Número de células sésseis (Log UFC/cm²) de *Staphylococcus aureus*, quantificadas nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, após 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais

Agentes sanificantes	Superfícies e tempo de exposição			
	Aço inoxidável (Log UFC/cm ²)		Polipropileno (Log UFC/cm ²)	
	5 minutos	10 minutos	5 minutos	10 minutos
Controle	7,09±0,06 ^{dB}	6,68±0,27 ^{cα}	6,32±0,02 ^{dA}	6,23±0,03 ^{cα}
Cravo	5,25±0,50 ^{CB}	4,23±0,36 ^{bα}	4,58±0,71 ^{CA}	4,27±0,57 ^{bα}
Tomilho	3,89±0,62 ^{BA}	0±0,00 ^{aα}	3,47±0,01 ^{BA}	0±0,00 ^{aα}
Combinação	0±0,00 ^{AA}	0±0,00 ^{aα}	0±0,00 ^{AA}	0±0,00 ^{aα}

*Resultados expressos pelas médias de contagem de células sésseis (Log UFC/cm²). Médias seguidas de diferentes letras latinas minúsculas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras latinas maiúsculas na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras gregas na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Tabela 5 Redução do número de células sésseis de *Staphylococcus aureus* (Log UFC/cm²) e em percentual, quantificadas nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, após 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais

Agentes sanificantes	Superfícies e tempo de exposição			
	Aço inoxidável (Log UFC/cm ²) - %		Polipropileno (Log UFC/cm ²) - %	
	5 minutos	10 minutos	5 minutos	10 minutos
Controle	0,29%-3,9% ^{aA}	0,70%-9,4% ^{aα}	0,26%-3,9% ^{aA}	0,35%-5,3% ^{aα}
Cravo	2,13%-28,8% ^{bA}	3,15%-42,6% ^{bβ}	2,00%-30,3% ^{bA}	2,31%-35,1% ^{bα}
Tomilho	3,49%-47,2% ^{cA}	7,38%-100% ^{cβ}	3,11%-47,2% ^{cA}	6,58%-100% ^{cα}
Combinação	7,38%-100% ^{dB}	7,38%-100% ^{cβ}	6,58%-100% ^{dA}	6,58%-100% ^{cα}

* Valores obtidos a partir da subtração do número de células aderidas sem nenhum tratamento sanificante dos cupons de aço inoxidável (7,38 Log UFC.cm⁻²) e polipropileno (6,58 Log UFC.cm⁻²), após 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais. Médias seguidas de diferentes letras latinas minúsculas na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras latinas maiúsculas na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas de diferentes letras gregas na mesma linha diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

A efetividade das soluções sanificantes à base de cravo, tomilho e sua combinação diferiu significativamente entre si, sendo a combinação mais efetiva na redução do número de células sésseis aderidas às superfícies. Observa-se que, após a exposição de cinco minutos dos cupons contendo o biofilme na solução sanificante à base da combinação destes óleos, foi eficaz para promover a não recuperação de células viáveis aderidas em ambas às superfícies. As eletromicrografias de varredura abaixo revelam a redução das células de *S. aureus* nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno (Figura 16).

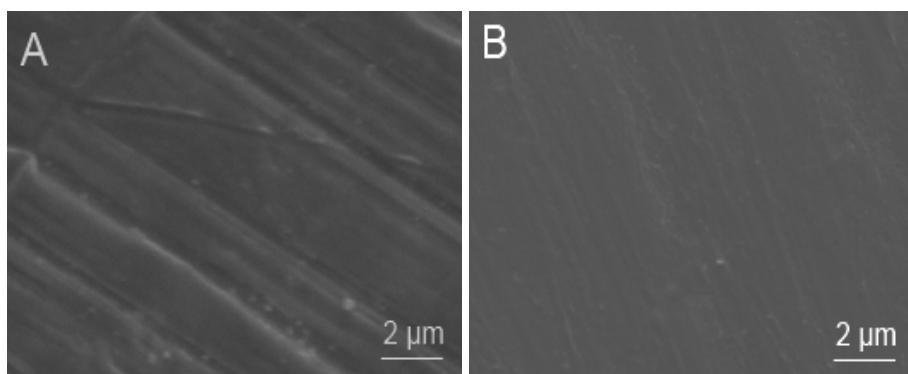


Figura 16 Eletromicrografias de varredura mostrando a redução das células de *Staphylococcus aureus* nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 (A) e polipropileno (B)

Nota-se também que a solução sanificante à base de tomilho foi mais efetiva que a de cravo. Esta solução possibilitou a não recuperação de células viáveis após uma exposição de dez minutos, em ambas as superfícies. A solução sanificante à base do óleo essencial de cravo foi a menos efetiva, apresentando redução do número de células sésseis, mas, após a exposição de dez minutos do cupom de aço inoxidável e polipropileno nesta solução, ainda foram recuperadas células viáveis.

Em estudo realizado por Oliveira et al. (2010) demonstrou-se a eficiência de soluções sanificantes formuladas à base de óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e capim-citronela (*Cymbopogon nardus*) e sua combinação, na eliminação de biofilme de *Listeria monocytogenes* formado em superfície de aço inoxidável. Neste estudo, todas as soluções sanificantes foram efetivas na redução do número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície, mas a solução formulada a partir da combinação dos dois óleos essenciais apresentou a melhor eficácia, possibilitando a não recuperação de células viáveis após 60 minutos de contato.

De acordo com recomendações da American Public Health Association, os desinfetantes físicos ou químicos têm de eliminar bactérias patogênicas e reduzir o número de microrganismos deteriorantes a níveis aceitáveis. Assim, pode-se afirmar que soluções sanificantes feitas à base de óleos essenciais foram eficientes e estão de acordo com estas recomendações propostas.

Pela análise das eletromicrografias de varredura obtidas, foram observadas alterações estruturais na superfície celular. Provavelmente, estas alterações foram causadas pela atuação dos óleos essenciais na membrana citoplasmática, provocando aumento da permeabilidade e extravasamento dos constituintes intracelulares.

Estudos realizados por Oliveira et al. (2010) revelaram, por meio de eletromicrografias de microscopia eletrônica de transmissão, alterações na parede celular do *Clostridium perfringens*, quando este foi tratado com óleo essencial de *Satureja montana*. As eletromicrografias das células da cultura não expostas ao óleo essencial tinham parede celular contínua, fina e lisa, e bem definidas as estruturas celulares. Já eletromicrografias das células que foram expostas ao tratamento com óleo essencial apresentaram alterações morfológicas na parede, como irregularidades e rugosidade, levando à ruptura da parede e à subsequente lise celular. Além disso, foram observadas aglutinação e

aglomeração de material intracelular no citoplasma das células, pois as eletromicrografias revelaram que estas células faltavam citoplasma em certas regiões devido à perda funcional da membrana provocada pela ação dos componentes químicos do óleo essencial de *S. montana*.

Danos nas células de *C. perfringens* também foram observados por Si et al. (2009), ao avaliarem o efeito de diferentes óleos essenciais na morfologia das células bacterianas por microscopia eletrônica de varredura. Foi observada, por estes autores, a formação de fissuras na parede celular de culturas tratadas com óleos essenciais, o que também pode ser observado neste estudo (Figura 17 D).

As eletromicrografias de varredura a seguir revelam as alterações estruturais provocadas pela ação dos óleos essenciais de cravo e tomilho nas células de *S. aureus* nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 e polipropileno (Figura 17).

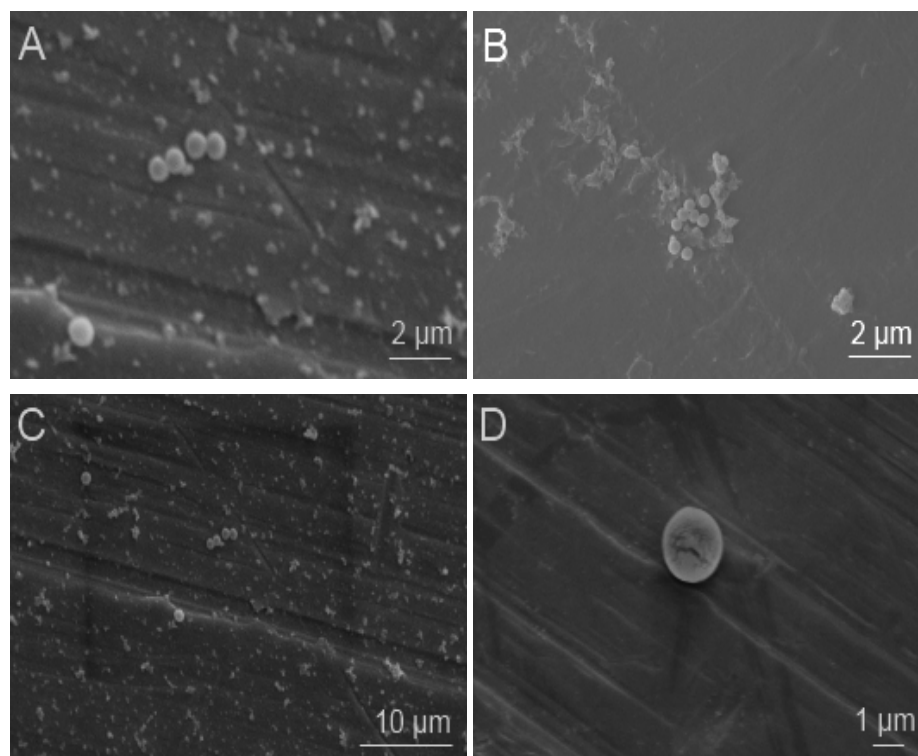


Figura 17 Eletromicrografias de varredura mostrando as alterações estruturais provocadas pela ação dos óleos essenciais de cravo-da-índia (A e C) e tomilho (B e D) nas células de *Staphylococcus aureus* nas superfícies de aço inoxidável AISI 304 (A,C e D) e polipropileno (B)

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e sua combinação apresentaram CMI de 0,10% sobre o *Staphylococcus aureus*. Todas as soluções sanificantes à base de óleos essenciais se mostraram efetivas na redução de biofilme bacteriano formado por *S. aureus* em superfícies aço inoxidável AISI 304 e polipropileno, sendo a solução à base da combinação dos dois óleos mais efetiva que as soluções à base do óleo de tomilho e cravo, individualmente. As eletromicrografias de varredura revelam alterações estruturais nas superfícies celulares, provocadas, possivelmente, pela ação desses óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura e de transmissão**. Lavras: FAEPE-UFLA, 2004. 54 p.
- ANDRADE, N. J. Aspectos de importância na higienização na indústria de laticínios. In: WORKSHOP SOBRE DESENVOLVIMENTO NO SETOR DE LEITE, 2., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2004. p. 14.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 833-838, July 1998.
- ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, São Paulo, v. 9, n. 53, p. 40-45, 2000.
- ARIDOGAM, B. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives of Pharmacology Research**, Mexico, v. 25, n. 6, p. 860-864, Dec. 2002.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 1, p. 33-42, Jan. 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Apr. 2008.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, maio/jun. 2009.
- 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, jul./ago. 2009.

BROWN, P. D.; MORRA, M. J. Glucosinolate: containing plant tissues as bioherbicides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 12, p. 3070-3074, Dec. 1995.

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, May 2004.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 3, p. 1914-1920, Mar. 2002.

CASTRO, C. S. B.; SALES, L. S.; GONZALEZ, B. M. Envelhecimento em um aço inoxidável AISI 304 contendo martensita induzida por deformação. **REM: Revista Escola de Minas**, Belo Horizonte, v. 60, n. 1, p. 111-115, 2007.

CASTRO, D. P. et al. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 27-32, set./dez. 2006.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. Guaíba: Agropecuária, 1995. 196 p.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 2, n. 1, p. 22-32, Feb. 2003.

CHONG, B. S.; FORD, T. R. P.; KARIYAWASAM, S. P. Short-term tissue response to potential root-end filling materials in infected root canals. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 240-249, Apr. 1997.

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, June 2008.

CISTON, S.; LUEPTOW, R. M.; GRAY, K. A. Bacterial attachment on reactive ceramic ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 320, n. 1/2, p. 101-107, Mar./Apr. 2008.

COX, S. D. The mode of antimicrobial of essential oil of *Malaleuca artemifolia*: tea tree oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 170-175, Jan. 2000.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. CG/EM analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, May 2000.

DAGBERT, C.; MEYLHEUC, T.; BELLON-FONTAINE, M. N. Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 51, n. 24, p. 5221-5227, Dec. 2006.

DELESPAUL, Q. et al. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, v. 12, n. 2, p. 256-266, Mar./Apr. 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

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

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Apr. 2000.

FARAG, R. S. et al. Antimicrobial activity of some Egyptian spice oils. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 9, p. 665-667, Sept. 1989.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos**. Lavras: UFLA, 2000. Software.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Varela, 2003. 246 p.

GIANOTTI, A. et al. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 5, p. 9-17, Mar. 2008.

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

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-9, Jan. 2006.

GRIFFIN, S. G. et al. The role of structure molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 14, n. 5, p. 322-332, Sept./Oct. 1999.

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

GUIMARÃES, L. G. de L. et al. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2008.

HARRISON, J. et al. A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. **American Scientist Classics**, Chicago, v. 93, n. 6, p. 508-515, Dec. 2005.

HERRERA, J. J. R. et al. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 585-591, June 2007.

ISMAIL, K. H. M. et al. The influence of bacteria on the passive film stability of 304 stainless steel. **Electrochimica Acta**, New York, v. 44, n. 26, p. 4685-4692, 1999.

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

- JOSEPH, B. et al. Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 64, n. 3, p. 367-372, Mar. 2001.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal proprieties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 10, n. 10, p. 813-829, Oct. 2003.
- KAPLAN, A. E. et al. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. **Endodontics and Dental Traumatology**, Arlington, v. 15, n. 1, p. 42-45, Jan. 1999.
- KNOWLES, J. R. et al. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803, Apr. 2005.
- KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, June 1998.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of 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, Mar. 2001.
- LINDSAY, D.; HOLY, A. What food professionals should know about bacteria biofilms. **British Food Journal**, Bradford, v. 108, n. 1, p. 27-37, Mar. 2006.
- LINDSAY, D.; NTOAMPE, M.; GRAY, V. M. Biodegradation of sodium benzoate by a Gram-negative consortium in a laboratory-scale fluidized bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 5115-5119, Nov. 2008.
- MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 2/3, p. 139-145, Jan. 1998.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo da índia e eugenol. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 231-238, mar./abr. 2003.

MCLANDSBOROUGH, L. et al. Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. **Food Biophysics**, Heidelberg, v. 1, n. 2, p. 94-114, June 2006.

MEI, H. C. et al. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins: a study in recombinant lactobacilli. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 28, n. 2/3, p. 127-134, Apr. 2003.

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

MEYLHEUC, T. et al. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. **Colloids and Surfaces, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 128-137, June 2006.

MEYRAND, A.; VERNIZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in different cheeses. **Revue Medicin Veterinaire**, Paris, v. 150, n. 7, p. 601-616, Sept. 1999.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; LERKIVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 1, p. 79-83, Jan. 2000.

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

NAGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 267 p.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 247-256, June 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antibacterial disk susceptibility tests: approved standard M2-A7**. Wayne, 2000. 7 p.

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

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

OLADIMEJI, F. A. et al. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, Stuttgart, v. 11, n. 2, p. 64-67, Feb. 2001.

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

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon sp.* essential oil 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.

OLIVEIRA, R. A. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Spaphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene e 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. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Spaphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

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

PARKAR, S. G.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Physiology of biofilms of thermophilic bacilli: potential consequences for cleaning. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v. 30, n. 9, p. 553-560, Sept. 2003.

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

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. 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, Apr. 2000.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.): propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBUHEL, A. Biotechnological production of vanillin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3/4, p. 296-314, June 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 out. 2010.

RAINA, V. K. et al. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour Fragrance Journal**, Chichester, v. 16, n. 5, p. 334-336, Sept./Oct. 2001.

RODE, T. M. et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 372-383, Sept. 2007.

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

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 77, n. 1/2, p. 61-70, Apr. 2002.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 61, n. 1, p. 81-85, Jan. 2000.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMBRAPA, 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 ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 53-75.

SARTORATTO, A. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 275-280, 2004.

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.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 6, p. 627-636, June 2002.

SHENG, X.; TING, Y. P.; PEHKONEM, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. **Journal of Colloid and Interface Science**, Atlanta, v. 310, n. 2, p. 661-669, Mar. 2007.

SI, W. et al. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards *Clostridium perfringens*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 1, p. 213-220, Jan. 2009.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1102 p.

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

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, Sept. 2010.

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

TSAO, R.; YU, Q. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, v. 12, n. 1, p. 350-354, Apr. 2000.

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

VEENING, J. W. et al. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, n. 8, p. 3099-3109, Aug. 2006.

WANKE, M.; SKORUPUPINSKA-TUDEK, K.; SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, Warsaw, v. 48, n. 3, p. 663-672, 2001.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 7, p. 727-733, Sept. 1999.