



APARECIDA SÍLVIA DOMINGUES

**BIOFILME DE *Bacillus cereus* EM SUPERFÍCIE
DE AÇO INOXIDÁVEL: AÇÃO BACTERICIDA E
ESPORICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

**LAVRAS-MG
2011**

APARECIDA SÍLVIA DOMINGUES

**BIOFILME DE *Bacillus cereus* EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL: AÇÃO BACTERICIDA E ESPORICIDA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Dr. Eduardo Alves

Coorientador

**LAVRAS – MG
2011**

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

Domingues, Aparecida Sílvia.

Biofilme de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável :
ação bactericida e esporicida de óleos essenciais / Aparecida Sílvia
Domingues. – Lavras : UFLA, 2011.

153 p. : il.

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

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Endósporos. 2. Sanitizantes. 3. Capim-limão. 4. Cardamomo.
5. Antimicrobianos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.028

APARECIDA SÍLVIA DOMINGUES

**BIOFILME DE *Bacillus cereus* EM SUPERFÍCIE DE AÇO
INOXIDÁVEL: CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE POR SANITIZANTES
À BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

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

APROVADA em 21 de fevereiro de 2011

Dra. Carolina Valeriano	UFLA
Dr. Olga Lúcia Mondragón Bernal	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG
2011**

*A Deus,
Pela presença insubstituível em cada instante da minha vida,*

DEDICO

*A Nossa Senhora,
Pela sua proteção de mãe e por estar presente em todos os momentos, em
especial nas dificuldades*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus Uno, Trino e Santo, pelo dom da vida e por caminhar comigo e cuidar de mim... “Porque Dele e por Ele, para Ele são todas as coisas”.

Aos meus queridos pais Geraldo e Rita, fonte de inesgotável amor e dedicação, aos quais devo todas as minhas conquistas, pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Ailton, e minhas irmãs Aelte, Eliane e Sirléia, pelo apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Pedro Henrique e Samuel, pelas alegrias e descontrações que me proporcionam.

Ao Marcos Vinícius pelo companheirismo e amor durante todos esses anos.

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

Ao CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

À professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, não somente por orientar meus passos acadêmicos, mas pelo zelo, amizade, apoio e pelos ensinamentos que vão muito além desta dissertação.

Ao professor Dr. Eduardo Alves, por permitir a utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Ao prof. Nélio José de Andrade, pela atenção e por permitir o uso do Goniômetro.

Ao prof. Mário César Guerreiro, pela atenção e por permitir o uso do Laboratório de Análise e Prospecção Química.

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

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

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Microscopia e Análise ultraestrutural - em especial a Cláudia e Eloísa.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelos momentos de convívio e partilhas de conhecimentos.

A Nayane e Alcilene pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e amizade.

A Eliane, pelo cafezinho das manhãs, pelas conversas e ensinamentos.

Aos estagiários, especialmente agradeço ao Paulo Henrique e Mariana pela amizade e ajuda durante a execução destes trabalhos.

As amigas de longa data, Elisângela e Lilian, e os mais recentes, Rosilene, Roberta, Vitor, Bryan, por todos os momentos compartilhados.

Aos meus eternos amigos da graduação Gi, Mara, Edimara, Cynthia e Roberta, da RCC e da Perseverança, obrigada pelas orações e pela convivência fraterna.

Aos colegas de Pós-Graduação, pela convivência agradável.

As secretárias do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Magda e Rose, pela atenção disponibilizada sempre.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas graça das graças é não desistir nunca.*

(D. Helder Câmara)

RESUMO

A adesão microbiana e conseqüente formação de biofilmes é um dos grandes problemas enfrentados na indústria de alimentos atualmente, devido o potencial de contaminação dos alimentos pelos mesmos. Dentre os microrganismos envolvidos, destaca-se a bactéria produtora de endósporos *B. cereus*, devido a sua ampla distribuição na natureza, capacidade de adesão e sobrevivência em condições adversas na forma de endósporos, produção de diferentes toxinas e deterioração de alguns produtos alimentícios. A eliminação normal requer o uso de sanitizantes com ação bactericida e esporicida, no entanto raros são os sanitizantes com essa característica. Assim, o desenvolvimento de novas alternativas de eliminação de células vegetativas e endósporos é fundamental. Este estudo teve como objetivos: caracterizar a superfície do aço inoxidável AISI 304 (#4) e correlacionar com adesão de células vegetativas e endósporos de *B. cereus* no mesmo; verificar a sensibilidade de células planctônicas e sésseis, bem como endósporos livres e aderidos aos sanitizantes à base de óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* e *C. citratus* individuais e em combinação além de determinar a composição química, a tensão superficial dos mesmos; avaliar pela microscopia eletrônica de varredura o aspecto morfológico do biofilme maduro, dos endósporos aderidos e ação dos óleos essenciais sobre os mesmo.

Palavras-chave: *B. cereus*. Endósporos. Cardamomo. Capim-limão.

ABSTRACT

Microbial adhesion and subsequent biofilm formation are major problems with which the food industry is currently faced, seeing as such phenomena are a major source of product contamination. Among the involved microorganisms, endospore producing bacteria *B. cereus* stands out, due to its broad distribution in nature, adhesion and survival capabilities under the form of endospores, toxin production, and to its potential to deteriorate certain food products. *B. cereus* elimination requires sanitizing products with both bactericidal and sporicidal properties. However, such sanitizers are rare, and such rarity can only be remedied through the development of new vegetative cell and endospore cleansing alternatives. This study has sought to characterize AISI 304#4 stainless steel surfaces, relating *B. cereus* vegetative cell and endospore adhesion to it; assess the planktonic and sessile cells' sensibility, as well as that of free and adhered endospores, to the essential oils of *Elettaria cardamomum* and *C. citratus*, both individually and combined; determine the chemical compositions, as well as superficial tensions, of such essential oils; evaluate, through scanning electron microscopy, the mature biofilm's morphological aspect, as well as that of the adhered endospores, and the changes induced in them by the essential oils.

Keywords: *B. cereus*. Endospores. Cardamom. Lemongrass.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Fundamentos e importância da higienização na indústria de alimentos	17
2.2	Biofilmes microbianos	18
2.3	Estrutura e composição do biofilme	19
2.3.1	Matriz de substâncias exopoliméricas (EPS)	21
2.4	Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação do biofilme	23
2.4.1	<i>Bacillus cereus</i>	24
2.4.2	Endósporos	26
2.5	Dinâmica de formação e maturação do biofilme	28
2.6	Fatores que influenciam o processo de adesão e formação do biofilme	31
2.7	Superfícies envolvidas na formação do biofilme	32
2.8	Controle e eliminação de biofilmes	33
2.9	Novas estratégias	34
2.9.1	Óleos essenciais	34
2.9	<i>Elettaria cardamomum</i>	40
2.10	<i>Cymbopogon citratus</i>	41
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	44
	CAPÍTULO 2 PROPRIEDADES BACTERICIDA E ESPORICIDA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Elettaria cardamomum</i> E <i>Cymbopogon citratus</i> SOBRE <i>Bacillus cereus</i>	56
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1	Locais de execução do experimento	62
2.2	Óleos essenciais	62
2.2.1	Caracterização química dos óleos essenciais	62
2.2.2	Tensão superficial dos óleos essenciais	63
2.3	Microrganismo	64
2.3.1	Padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa	64
2.3.2	Padronização, estocagem e preparo do inóculo do endósporo	65
2.4	Ação bacteriostática	66
2.4.1	Inibição da germinação do endósporo (ação esporostática)	67
2.4.2	Tempo de ação bactericida	68

2.4.3	Tempo de ação esporicida	69
2.5	Delineamento experimental e análise estatística	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1	Composição química dos óleos essenciais	70
3.2	Determinação da tensão superficial dos óleos essenciais	71
4	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79
	CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE	
	BIOFILME DE <i>Bacillus cereus</i> EM SUPERFÍCIE DE AÇO	
	INOXIDÁVEL	83
1	INTRODUÇÃO	86
2	MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1	Locais de execução do experimento	89
2.2	Microrganismo	89
2.2.1	Padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa	89
2.3	Superfície	90
2.3.1	Procedimento de higienização dos cupons e do suporte de aço inoxidável	91
2.3.2	Condicionamento da superfície dos cupons	91
2.3.3	Medidas de ângulo de contato	92
2.4	Adesão das células vegetativas de <i>Bacillus cereus</i> a cupons de aço inoxidável	93
2.5	Determinação do número de células aderidas	93
2.6	Procedimento de higienização dos cupons com biofilmes	94
2.7	Determinação do número de células aderidas após a sanitização da superfície	95
2.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	95
2.9	Delineamento experimental e análise estatística	96
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1	Análises dos ângulos de contato	97
3.2	Adesão de <i>Bacillus cereus</i> ao aço inoxidável	98
3.3	Sanitização do biofilme de <i>B. cereus</i> em superfície de aço inoxidável	107
4	CONCLUSÃO	114
	REFERÊNCIAS	115
	CAPÍTULO 4 <i>Bacillus cereus</i>: ADESÃO DE ENDÓSPOROS E	
	RESISTÊNCIA A SANITIZANTES À BASE DE ÓLEOS	
	ESSENCIAIS	120
	RESUMO	121
	ABSTRACT	122
1	INTRODUÇÃO	123

2	MATEIRAL E MÉTODOS	126
2.1	Locais de execução do experimento	126
2.2	Microrganismo	126
2.2.1	Padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa	126
2.2.2	Padronização, estocagem e preparo do inóculo do Endósporo	126
2.3	Superfícies	126
2.3.1	Procedimento de higienização dos cupons e do suporte de aço inoxidável	127
2.3.2	Condicionamento da superfície dos cupons	127
2.3.3	Medidas de ângulo de contato	127
2.4	Adesão de endósporos de <i>Bacillus cereus</i> a cupons de aço inoxidável sem e com filme condicionante	127
2.5	Determinação do número de células aderidas	128
2.7	Tensão superficial dos óleos essenciais	128
2.8	Procedimento de higienização dos cupons aderidos com endósporos	128
2.9	Determinação do número de endósporos após sanitização da superfície	129
2.10	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	129
2.11	Delineamento experimental e análise estatística	129
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	130
3.1	Análise do ângulo de contato	130
3.2	Adesão de endósporos <i>Bacillus cereus</i> ao aço inoxidável	132
3.3	Sanitização dos endósporos aderidos em superfície de aço inoxidável	134
4	CONCLUSÃO	141
	REFERÊNCIAS	142

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Apesar do avanço nas técnicas de processamento e de higienização, a quantidade e a gravidade de doenças relacionadas a alimentos em todo o mundo têm aumentado as exigências dos consumidores em relação à qualidade dos alimentos que levam à mesa. Assim, a segurança dos alimentos constitui preocupação constante para a indústria, os consumidores e os órgãos de saúde pública.

Em geral, o grande problema para indústria de alimentos tem sido as condições higiênicas das superfícies dos equipamentos e dos utensílios. Uma superfície mal higienizada, somado à capacidade de adesão de microrganismos e formação de biofilme, pode se tornar fonte potencial de contaminação. Uma vez formados os biofilmes são de difícil remoção, sendo importante evitá-los desde processos iniciais e antes que os microrganismos sintetizem substância exopoliméricas. Para isso, a realização de um processo de higienização adequado que siga corretamente os procedimentos e normas de limpeza e sanitização, como por exemplo, o controle da concentração da solução e tempo de contato é fundamental.

Na indústria de alimentos a formação de biofilme é motivo de preocupação, uma vez que causam problemas de ordem econômica e produtiva, como a diminuição da transferência de calor, a perda da vida útil dos equipamentos por corrosão, a contaminação cruzada e a veiculação de microrganismos patogênicos aos alimentos.

As bactérias, produtoras de endósporos estão entre as principais responsáveis pelos problemas de deterioração na indústria de alimentos. O *Bacillus cereus* e seus endósporos são comumente encontrados em ambientes industriais, podendo contaminar desde as matérias-primas até os alimentos processados e provocando diferentes alterações, sendo frequentemente

relacionados a surtos alimentares. O fato dos endósporos e dos biofilmes de *B.cereus* possuírem maior resistência aos sanitizantes e capacidade de adesão que as células vegetativas, devido a sua alta hidrofobicidade e morfologia, a escolha de um sanitizante que seja eficiente contra células vegetativas e ao mesmo tempo contra endósporos é primordial para manter a qualidade na indústria de alimentos. O *B. cereus* apresenta capacidade de aderir e formar biofilmes em diferentes superfícies, o que dificulta a eliminação e até mesmo sua diminuição nos ambientes industriais e, conseqüentemente contribuem para sua ocorrência e persistência nos alimentos.

Várias pesquisas buscam a utilização de novos compostos antimicrobianos como alternativa aos tradicionais, devido principalmente ao declínio do número de aprovações de novos fármacos e a perda de proteção de patentes. Além disso, observa-se aumento do número de bactérias que se mostram resistentes aos agentes sanitizantes, tanto na área médica quanto na indústria de alimentos. Os sanitizantes de interesse na indústria de alimentos devem possuir eficiência na eliminação de células planctônicas, sésseis e endósporos simultaneamente. Portanto, novas pesquisas devem ser desenvolvidas para esse fim. O potencial de aplicação de compostos antimicrobianos à base de óleos essenciais ou de seus constituintes é uma alternativa que está sendo atualmente estudada.

Óleos essenciais são produtos voláteis e odoríferos obtidos do metabolismo secundário de plantas. Dessa forma, os óleos essenciais passaram a ter atenção dos pesquisadores visando à obtenção de compostos ou misturas deles a fim de utilizá-los com agentes antimicrobianos. Entre as espécies aromáticas, a *Elettaria cardamomum* e o *Cymbopogon citratus*, conhecidos popularmente como cardamomo e capim-limão, respectivamente apresentam inúmeras atividades biológicas, reflexo da sua composição química complexa.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou:

- a) avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* e *Cymbopogon citratus*, individual e em combinação sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579;
- b) avaliar a atividade esporicida dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus*, individual e em combinação;
- c) avaliar a ação sanificante dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus*, individual e em combinação sobre biofilme de *B. cereus* ATCC 14579 formado em superfície de aço inoxidável AISI 304;
- d) avaliar a ação sanificante dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus*, individual e em combinação sobre endósporos de *B. cereus* ATCC 14579 aderidos em superfície de aço inoxidável AISI 304;
- e) avaliar a hidrofobicidade da superfície de aço inoxidável, AISI 304 e das células de *B.cereus* ATCC 14579;
- f) medir a tensão superficial dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus*;

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fundamentos e importância da higienização na indústria de alimentos

Na área de prevenção geral de doenças infecciosas a desinfecção e a esterilização representam papel fundamental na redução do risco de infecções. Estes processos são fundamentais também pra a indústria alimentar (SANSEBASTIANO; ZONI; BIGLIARDI, 2007).

Na indústria de alimentos, a higienização inclui duas etapas fundamentais: limpeza e sanitização. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais. A sanitização, por sua vez, tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos alteradores para níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008).

As etapas do processo de higienização; a limpeza e a sanitização dos equipamentos e utensílios que entram em contato com os alimentos, são geralmente realizados por métodos físicos e/ou químicos. Esses processos devem remover corpos e desinfetar as superfícies (SANSEBASTIANO; ZONI; BIGLIARDI, 2007).

Segundo Dutra (2006), os alimentos podem ser contaminados por bactérias patogênicas e deteriorantes, como resultado de condições de higiene deficiente durante seu processamento. A contaminação pode partir de pessoas ou animais doentes e/ou a partir de fezes provenientes de indivíduos infectados, somados às más práticas de fabricação.

Devido à necessidade da indústria alimentícia de produzir alimentos seguros, o controle higiênico, sanitário e tecnológico, constitui-se em fator preponderante para evolução técnica e industrial (DUTRA, 2006).

A higienização na indústria de alimentos é fundamental para a garantia da segurança dos alimentos, seja para o mercado externo ou interno. Procedimentos de higienização deficientes levam à formação de biofilmes microbianos sobre superfícies. A natureza dessas estruturas dificulta o processo de higienização industrial. Métodos convencionais de limpeza e sanitização são geralmente ineficientes em superfícies com formação de biofilme bacteriano (KORENBLUM et al., 2008).

As operações de limpeza e sanitização devem ser realizadas com rapidez e regularidade (entre os ciclos de produção), para remover e eliminar efetivamente as bactérias em estágio inicial de adesão, impedindo a contaminação das matérias-primas, produtos acabados e protegendo a saúde dos consumidores (MAFU et al., 2010).

Para minimizar as contaminações em superfícies, é necessário conhecer as diferentes condições ambientais que a promovem e que afetam a sobrevivência dos microrganismos, a fim de reduzir sua incidência na indústria de alimentos.

2.2 Biofilmes microbianos

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas como comunidades sésseis (células microbianas associadas a diversos tipos de superfície), com diferentes graus de complexidade, em estruturas conhecidas como biofilmes (WATINICK; KOLTER, 2000; WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003). Estudos do desenvolvimento microbiano tem demonstrado que os microrganismos são capazes de diferenciação e comportamentos complexos (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

Na maior parte da história da microbiologia, microrganismos foram essencialmente caracterizados por cultivo de células planctônicas e descritos com base nas características do seu crescimento em meios de cultura nutricionalmente ricos (DAVEY; O'TOOLE, 2000; DONLAN, 2002). No entanto, o paradigma da célula planctônica não reflete com precisão o crescimento bacteriano na natureza.

Os microrganismos são frequentemente vistos como criaturas simples quando comparados aos organismos superiores. A redescoberta do fenômeno microbiológico, primeiramente descrita por Van Leeuwenhoek, de que os microrganismos crescem de forma agregada sobre as superfícies expostas levou a estudos que revelaram associação microbiana em superfície (DONLAN, 2002).

Biofilmes podem ser definidos como um complexo ecossistema microbiológico formado por população microbiana envolta numa matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que são produzidas pelos próprios microrganismos (COSTERTON; WILSON, 2004; PARSEK; FUQUA, 2004) podendo ser compostos por população desenvolvida a partir de uma única espécie ou por comunidades derivadas de múltiplas espécies microbianas aderidas a superfícies vivas (bióticas) ou inertes (abióticas) (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

2.3 Estrutura e composição do biofilme

Biofilmes são comunidades estruturadas de células aderidas as superfícies e envolvidas numa matriz polimérica (HAMON; LAZAZZERA, 2001; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000), tais associações são eficientes meios de tornar o microambiente mais favorável aos microrganismos (WATINICK; KOLTER, 2000).

A matriz polissacarídica que envolve o biofilme pode ser comparada com um sistema de enzimas imobilizadas em que o meio e as atividades enzimáticas estão em constante mudança (SUTHERLAND, 2001). Grande parte da matriz (até 97%) é constituída por água, dependendo de cada sistema. A água presente pode ser parte da composição das células ou existir livre no meio circundante, agindo como solvente. Além de água e células microbianas, a matriz do biofilme é formado por um complexo de polímeros secretados, isto é, substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Os EPS são constituídos por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, formando uma espécie de crosta, sob a qual, os microrganismos continuam a crescerem, formando cultivo puro ou associação com outros microrganismos, aumentando a proteção contra agressões químicas e físicas (PARIZZI et al., 2004; SUTHERLAND, 2001; XIOAQI; BISHOP; KUPFERLE, 1998).

A composição do biofilme está representada na Tabela 1.

Tabela 1 Composição da matriz do biofilme

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

Fonte: Surtheland (2001)

Na maioria dos biofilmes, os microrganismos constituem menos de 10% da matéria seca, enquanto a matriz pode ser responsável por mais de 90% (FLEMMING; WINGENDER, 2010). O topo e a base do biofilme tem maior densidade de células, e muitas vezes existem canais, para o transporte de água, nutrientes e resíduos (REN; SIMS; WOOD, 2002). As células dentro do biofilme estão sujeitas a gradientes de nutrientes, que normalmente resultam em

células metabolicamente ativas, ou seja, com acesso a nutrientes, na superfície intermediária do biofilme e células metabolicamente inativas no líquido sobreposto à periferia e na superfície mais interna (PARSEK; FUQUA, 2004). Os biofilmes contêm células bacterianas em diferentes estágios de desenvolvimento fisiológicos.

2.3.1 Matriz de substâncias exopoliméricas (EPS)

A composição da matriz, como exemplificado por Wimpenny (2001) é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos surgem de acordo com o perfil genético dos componentes das células microbianas, fatores extrínsecos incluem o ambiente físico-químico no qual o biofilme e sua matriz estão localizados, o que, inevitavelmente, é constantemente influenciado pelo transporte de soluto e gradientes de difusão. Devido a grande variedade de substâncias que constituem o EPS e a dificuldade de analisá-los tem sido chamado de “matéria escura de biofilmes”(FLEMMING; NEU; WOZNIAK., 2007; SHENG; YU; YU, 2005) (Quadro 1).

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

Quadro 1 Funções das substâncias extracelulares poliméricas em biofilmes bacterianos

Função	Relevância para o biofilme	Componentes envolvidos EPS
Adesão	Permite a fixação inicial e colonização de superfícies abióticas e bióticas por células planctônicas e a longo tempo, dispersão para outras superfícies	Polissacarídeos, Proteínas, DNA, moléculas anfifílicas

“Continua...”

Quadro 1 “continuação”

Função	Relevância para o biofilme	Componentes envolvidos EPS
Agregação das células bacterianas	Permite ligação entre as células, a imobilização temporária de populações bacterianas, o desenvolvimento de altas densidades celulares e o reconhecimento célula-célula	Polissacarídeos, proteínas e DNA
Coesão do biofilme	Forma rede de polímero hidratado (matriz do biofilme), mediando a estabilidade mecânica do biofilme (muitas vezes em conjunto com cátions polivalentes) e, através da estrutura do EPS (cápsula, bainha), determina a arquitetura do biofilme, bem como permite a comunicação célula-célula	Polissacarídeos neutros e carregados, proteínas e DNA
Retenção de água	Mantém o microambiente altamente hidratadas em torno do biofilme, levando à tolerância de dessecação em ambientes deficientes de água	Polissacarídeos hidrofílicos, e proteínas
Barreira protetora	Confere resistência inespecífica e específica, durante infecção, e confere tolerância a diversos agentes antimicrobianos (por exemplo, desinfetantes e antibióticos)	Polissacarídeos e proteínas
Sorção de compostos orgânicos	Permite o acúmulo de nutrientes do meio e a sorção de xenobióticos (contribuindo assim para a desintoxicação do meio ambiente)	Polissacarídeos hidrofóbicos e proteínas
Função	Relevância para o biofilme	Componentes envolvidos EPS
Sorção de íons orgânicos	Promove a formação de gel de polissacarídeo, troca iônica, formação mineral e acúmulo de íons metálicos tóxicos (contribuindo para a desintoxicação do ambiente)	Polissacarídeos e proteínas carregadas, incluindo substâncias inorgânicas, fosfatos e sulfatos
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas de nutrientes exógenos, aquisição e degradação do EPS estrutural, e a liberação de células do biofilme	Proteínas
Sorção de nutrientes	Fornecer fonte de carbono, nitrogênio e fósforo	Potencialmente todos os constituintes do EPS
Troca de material genético	Facilita a transferência de genes entre células do biofilme	DNA

“Continua...”

Quadro 1 “conclusão”

Função	Relevância para o biofilme	Componentes envolvidos EPS
Doação e recepção de elétrons	Permite atividade redox na matriz do biofilme	Proteínas
Exportação de componentes celulares	Eliminação de material celular como trocas metabólicas	Vesículas contendo ácidos nucléicos, enzimas, lipopolissacarídeos e fosfolipídios
Eliminar excesso de energia	Elimina excesso de carbono e nitrogênio em desequilíbrio	Polissacarídeos
Ligação de enzima	Resulta na acumulação, retenção e estabilização de enzimas e suas interações com polissacarídeos	Polissacarídeos e enzimas

Fonte: Flemming e Wingender (2010)

2.4 Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação do biofilme

Vários microrganismos são capazes de aderir e formar biofilmes em diversos tipos de superfícies, podendo ser divididos em deteriorantes e patogênicos. Na indústria de alimentos, o grupo de maior predominância é o das bactérias, cujas elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares, fazem aptas a formação de biofilme (NITSCHKE, 2006; CHARACKLIS, 1990).

Segundo Andrade; Bridgeman; Zottola (1998) para se considerar um biofilme é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 . Porém, outros pesquisadores consideram valores menores, como Ronner; Wong (1993) e Wirtanen; Husmark; Mattila-Sandholm (1996) que consideram como biofilme um número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 respectivamente.

Dentre as espécies bacterianas que podem participar de processos de adesão e formação de biofilmes na indústria de alimentos e causar riscos

destaca-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp., *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (ALTMAN et al., 2009; LINDSAY et al., 2002; PARIZZI et al., 2004; POIMENIDOU et al., 2003; WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003).

2.4.1 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus apresenta-se na forma de bastonete Gram-positivo, é aeróbio facultativo, sendo caracterizado pela formação de endósporos. Tem duas formas morfológicas: endosporo e célula vegetativa (VALERO et al., 2006).

B. cereus é potencial causador de doenças com origem alimentar devido a sua capacidade de produção de diversas enterotoxinas (ANDERSSON; RONNER; GRANUM, 1994; ENEROTH et al., 2001) que podem se manifestar tanto na forma emética como na forma diarréica (GRANUM, 2001), e implicado em vários surtos envolvendo diversos produtos, como arroz, macarrão, carne, legumes e laticínios (DIERICK et al., 2005). No último relatório da EFSA (European Food Safety Authority, 2007) sobre surtos, *B. cereus* foi o agente causador de 77 surtos de toxinfecções representando 17,1% dos casos devido a toxinas bacterianas. Sendo patógeno, causa toxinfecções pela produção de enterotoxinas (GRANUM, 2001).

A capacidade de *B. cereus* em produzir e secretar certas toxinas são os mais importantes aspectos bioquímicos deste microrganismo. Inúmeras linhagens sintetizam grande variedade de metabólitos extracelulares, incluindo enzimas que podem promover a deterioração dos alimentos (GRANUM, 1994; LINDSAY et al., 2002). Até agora foram identificadas sete toxinas diferentes, dessas, seis são produzidas e secretadas durante o crescimento vegetativo da

bactéria no intestino, a outra uma toxina emética, é produzida durante o crescimento bacteriano no alimento. Dentre as toxinas pode-se citar a citolisina, que se liga ao colesterol (cereolisina O ou hemolisina I), a hemolisina II, a hemolisina III e a hemolisina IV. Além da hemolisina BL (HBL), ainda existem as enterotoxinas não hemolítica (NHE) e a citotoxina K (BHUNIA, 2008; GRANUM, 1994; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

Dentre as enzimas produzidas por este microrganismo destacam-se as fosfolipases, a lecitinase, a esfingomielinase, a colagenase, a protease, a amilase e a β -lactamase. Esta promove a inativação da penicilina tornando, assim, o *B. cereus* resistente a este antibiótico (BHUNIA, 2008; GRANUM, 1994; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

As toxinas diarreicas são produzidas durante a multiplicação de *B. cereus* no intestino delgado humano, sendo necessária a ingestão de grande número de células viáveis pelo indivíduo para que a doença ocorra. A dose infectante para ocasionar a síndrome diarreica é estimada entre 10^4 a 10^5 células viáveis (GERMANAO; GERMANO, 2003; GRANUM, 1994; NOTERMANS et al., 1997). A síndrome diarreica caracteriza-se por provocar o quadro de diarreia intensa e dores abdominais no indivíduo, sendo a ocorrência de náusea e vômitos rara. O período de incubação da doença varia entre 8 a 16 horas (AGATA, OHTA, YOKOYAMA, 2002; GRANUM, 1994).

A toxina emética produzida pelo *B. cereus* é denominada cereulida, possui massa molecular de 1,2 kDa e consiste em três repetições de quatro aminoácidos modificados (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val) que formam a estrutura em anel, é termoestável no alimento, causando toxínose típica (BHUNIA, 2008; KUSE et al., 2000; RAJKOWSKI; BENNETT, 2003).

Este tipo de toxínose é descrito por causar sintomas como náuseas, vômitos e mal estar geral, e em poucos casos diarreia. Caracteriza-se por período curto de incubação entre 1 e 6 horas (AGATA; OHTA; YOKOYAMA, 2002;

GRANUM, 1994). A toxina diarreica difere-se da emética pela baixa estabilidade em relação à temperatura, enzimas proteolíticas e variações de pH (JOHNSON; NELSON; BUSTA, 1983).

Uma variedade de espécies de *Bacillus* tem sido demonstrada por ser capaz de formar biofilmes em superfícies de metal e produzir elaboradas comunidades multicelulares que apresentam características arquitetônicas, como projeções aéreas que se estendem em toda superfície do biofilme (BRANDA et al., 2004).

2.4.2 Endósporos

O ciclo vegetativo das bactérias caracteriza-se sumariamente pela duplicação do material genético, seguida da divisão celular, originando novas células. Quando a reprodução celular torna-se comprometida devido ao estresse ambiental, as respostas genéticas e metabólicas de algumas espécies direcionam-se conjuntamente para iniciar o processo de esporulação (SERRANO et al., 2001). Assim, com relação à formação do endósporo bacteriano (Figura 1) pode-se dizer que é uma forma de manutenção da viabilidade microbiana (REAL; HENRIQUES, 2001).

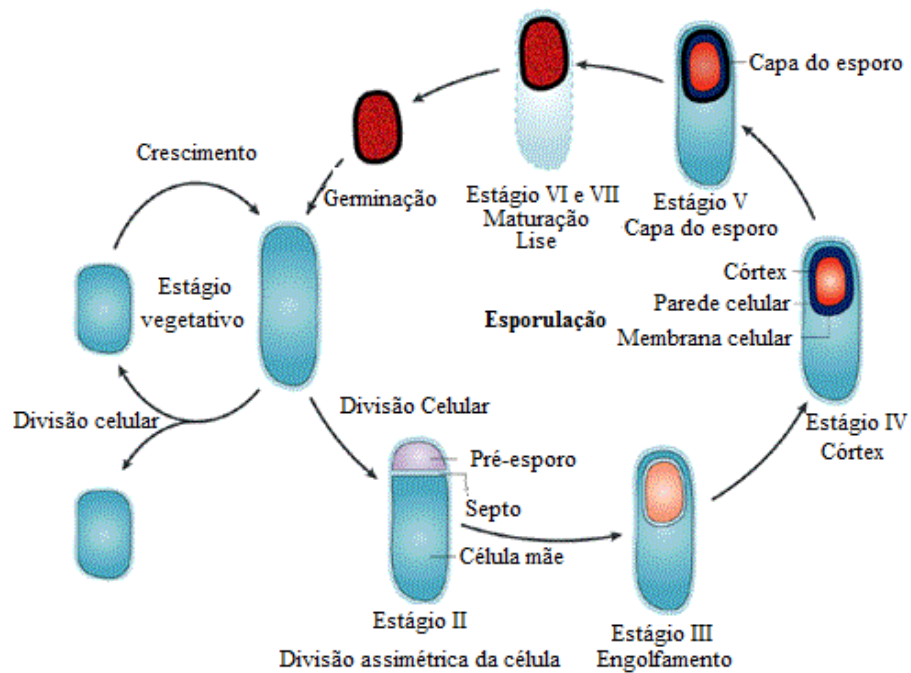


Figura 1 Esquema das principais fases do ciclo de vida de *Bacillus* sp.
Fonte: Adaptado de Errington (2003)

Endosporos de *B. cereus* estão presentes em solos sendo regularmente disseminados nos produtos agrícolas crus e conseqüentemente encontrados em várias etapas da cadeia alimentar devido a sua resistência a agentes físicos e químicos (VALERO et al., 2006).

Uma das características de *B. cereus* é sua habilidade de produzir endosporos altamente resistentes ao calor, o que garante a ele a sobrevivência durante etapas de processamento dos alimentos (RYU; BEAUCHAT, 2005; SCHELDAMAN et al., 2005).

A presença de endosporos de *Bacillus* no alimento pode causar danos e grandes prejuízos à indústria de alimentos. A presença de células vegetativas de

B. cereus é frequentemente implicada em gastroenterites de origem alimentar, mas também pode dar origem a deterioração, causando problemas na indústria de laticínios como a coagulação doce e desenvolvimento de diversos sabores estranhos no leite (FAILLE; FONTAINE; BENÈZECH, 2001).

Pesquisas revelam que *B. cereus* produz endósporos altamente hidrofóbicos que aderem firmemente a vários substratos inertes. Uma vez que o primeiro passo da adesão tenha sido completado, a colonização pode ocorrer quando condições ambientais tornam-se favoráveis à germinação do endósporo (BRANDA et al., 2004; FAILLE ; FONTAINE; BENÈZECH, 2001; JULLIEN et al., 2002), que pode acontecer nas temperaturas entre 5 °C e 50 °C com tempo de geração entre 26 e 57 minutos (JOHNSON, 1984).

2.5 Dinâmica de formação e maturação do biofilme

Os microrganismos passam por intensas mudanças durante a transição de células planctônicas para células sésseis e a posterior organização em comunidades altamente complexas (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000).

O desenvolvimento do biofilme bacteriano inclui tanto o comportamento individual, as interações iniciais das células indiferenciadas, assim como a morte celular e a diferenciação no biofilme maduro (WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003). O biofilme forma-se em qualquer superfície sólida onde haja presença bacteriana, sendo que sua formação ocorre em uma sequência de eventos:

- a) os nutrientes dos alimentos são adsorvidos na superfície formando um filme condicionante. Isso leva a uma alta concentração de nutrientes, e favorece a formação de biofilmes. A camada de nutrientes afeta ainda as propriedades físico-químicas da superfície,

por exemplo, mudança na hidrofobicidade e as cargas eletrostáticas, as quais influenciam as condições de colonização.

- b) Após a formação dessa camada a bactéria se aproxima da superfície, de modo que sua mobilidade seja retardada. A bactéria pode, então, formar uma associação transitória com a superfície e/ou outros microrganismos anteriormente ligados à superfície. Esta associação transitória permite a busca de um lugar para se estabelecer. A adesão inicial é controlada por interações eletrostáticas e por forças físicas, como força de Van der Waalls, força de Lewis e ligações de hidrogênio. Estas forças estão diretamente relacionadas com as propriedades físico-químicas das superfícies a serem aderidas e da superfície do microrganismo, que são a hidrofobicidade e a carga elétrica.
- c) Após a adsorção ocorrem à adesão irreversível e crescimento das células bacterianas nas superfícies. Durante essa fase, as células produzem mais polímeros, que aumentam sua fixação e estabilizam as colônias contra flutuações do ambiente.
- d) Junto à adesão contínua ocorre a produção de moléculas sinalizadoras, transporte de substratos, multiplicação celular, replicação, produção de EPS, levando a formação de biofilme.
- e) Com o tempo, o biofilme começa a liberar partículas relativamente grandes de biomassa. As bactérias das partes liberadas podem contaminar o alimento e/ou iniciar a formação de um novo biofilme (BREYERS; RATNER, 2004; KREPSKY et al., 2003; RAZATOS et al., 1998; WATNICK; KOLTER, 2000).

O carácter irreversível da adesão é geralmente mediado pela produção do EPS e pela presença de apêndices (pili, flagelo, proteínas adesina) (SIMÕES;

SIMÕES; VIEIRA,. 2010; FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007; CHARACKLIS, 1990).

Vários mecanismos são utilizados para o transporte das células, incluindo movimento *browniano*, sedimentação devido a diferenças de gravidade específica entre bactérias e o líquido do meio e transporte de massa, pelo qual as bactérias são transportadas pelo movimento do fluxo (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Assim, a primeira etapa envolvida na formação do biofilme, ocorre inicialmente com a adsorção reversível a superfície. Durante a adesão reversível, as bactérias ainda exibem movimentos *brownianos* e são facilmente removidas pela aplicação de uma força mínima (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Na Figura 2, tem-se a ilustração das etapas do mecanismo de adesão bacteriano.

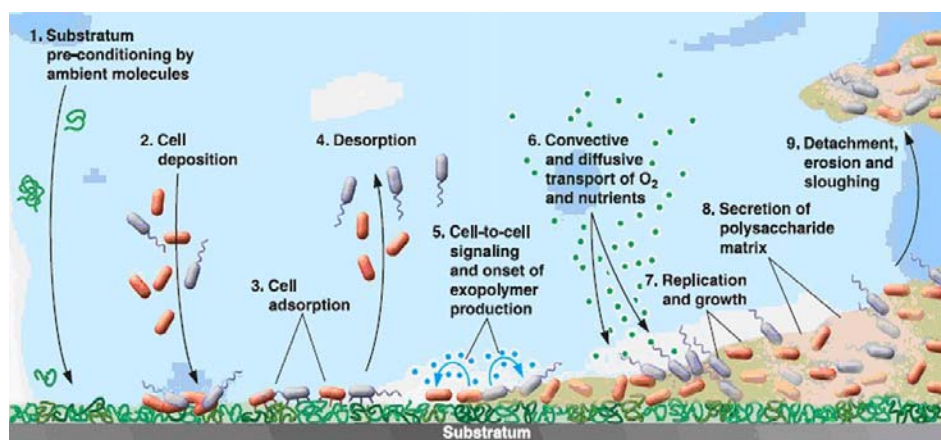


Figura 2 Processo de formação do biofilme (Breyers e Ratner, 2004)

Estudos indicam que os biofilmes são pontos estáveis no ciclo biológico que inclui iniciação, maturação, manutenção e dissolução. Bactérias parecem iniciar o desenvolvimento de biofilme em resposta a determinada mudança no

meio, como a disponibilidade de nutrientes (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). A remoção das células aderidas de forma irreversível torna-se difícil, exigindo aplicação de forças físicas, tais como alto cisalhamento e aplicação de agentes químicos para interromper as ligações célula-superfície (SINDE; CARBALLO, 2000), ou através de reações internas ou externas que provocam o descolamento e a perda de regiões do biofilme (JENKINSON; LAPIN-SCOTT, 2001).

2.6 Fatores que influenciam o processo de adesão e formação do biofilme

Segundo Laspido e Rittmann (2004) as propriedades físicas das células desempenham papel importante no controle da sua atividade metabólica e sua capacidade de se aderir ao substrato. Vários estudos têm descrito o fenômeno de adesão bacteriana em termos de parâmetros físico-químicos, tais como hidrofobicidade (MARK et al., 1987), energia de superfície (ABSOLOM, et al., 1983; BUSSCHER et al., 1984) e interações eletrostáticas das partículas celulares com as superfícies (BAYER; SLOYER, 1990).

Portanto, para entender o processo de adesão é necessário conhecimento das características físico-químicas do material do substrato e da superfície da célula. A possibilidade de se formar ligações específicas entre a bactéria e superfície depende da composição química da superfície e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE; BUSALMEN; SÁNCHEZ, 2002). A adesão bacteriana e formação de biofilme são influenciadas por vários fatores tais como: condições da superfície (ranhuras e rugosidades) e tipos de nutrientes presente no meio (HILBERT et al., 2003), temperatura de crescimento (CHAVANT et al., 2002; GIOVANNACCI et al., 2000), pH, temperatura, tempo de exposição (DI BONAVENTURA, et al., 2007; MAFU et al., 2010), interações - eletrostática e física - entre a superfície e a célula bacteriana

(MAZUMDER et al., 2010), e a comunicação entre células, isto é, o mecanismo *quorum sensing* (ANNOUS et al., 2009).

A adesão de *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* em superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas em culturas a diferentes pHs (6, 7 e 8) foi avaliada por Mafu et al (2010). Os resultados indicaram que os patógenos podem se adaptar aos diferentes pH dos meios culturas e se aderir independentemente das superfícies (MAFU et al., 2010).

A morfologia das células (motilidade, pili, flagelo, fimbrias, adesinas, ácido lipoteicoico e cápsula) exerce fundamental importância no processo de ancoragem e aderência das células à superfície (PRAKASH; VEEGOWDA; KRISHNAPPA, 2003; TRACHOO, 2003).

2.7 Superfícies envolvidas na formação do biofilme

Biofilmes podem ser formados em grande variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos, sistema de tubulações industriais e de água potável, ou sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002). A possibilidade de formar ligações específicas entre a superfície e o microrganismo depende da sua composição química e da composição da camada mais externa da célula (VALCARCE; FONTAINE; BENÈZECH et al, 2002).

Na indústria de alimentos um número considerável de superfícies utilizadas permite o processo de adesão microbiana, tais como aço inoxidável, vidro, ferro fundido, borracha, polipropileno, polietileno de baixa densidade e policarbonato (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998; GIOVANNACCI et al., 2000; HILBERT et al., 2003; PARIZZI et al., 2004). Estima-se que mais de 90% dos microrganismos vivam na forma de biofilmes

(DONLAN, 2002) e praticamente não existe nenhuma superfície que não possa ser colonizada por bactérias (CHARACKLIS, 1981).

Na indústria de alimentos, o aço inoxidável é o material comumente usado na fabricação de equipamentos e utensílios em geral (JULLIEN et al., 2002), porém é frequentemente associado a contaminação microbiana, devido a adesão e formação de biofilmes no mesmo (HILBERT et al., 2003).

2.8 Controle e eliminação de biofilmes

A indústria de alimentos deve adotar estratégias de caráter preventivo para o controle do biofilme. Para tal, é necessário implementar procedimentos eficientes de limpeza. No entanto, tais medidas nem sempre são suficientes para evitar a formação e acúmulo de biofilmes nas superfícies. Quando os métodos de limpeza não são suficientes para evitar a formação de biofilme, as substâncias químicas com propriedades antimicrobianas são utilizadas.

São considerados agentes antimicrobianos, todas as substâncias que possuem uma ou mais zonas ativas capazes de estabelecer interações com componentes celulares em sítios-alvo específicos das células microbianas (PAULUS, 1993). De forma geral, antimicrobiano define-se como sendo uma substância que exerce um efeito adverso na viabilidade ou no crescimento e reprodução do microrganismo (GAYLARDE; MORTON, 1999; PAULUS, 1993).

Dentre os agentes antimicrobianos tradicionais utilizados na formulação de sanitizantes para indústria de alimentos têm-se os de caráter oxidantes e os não oxidantes. Entre os agentes pode-se citar os compostos clorados (cloro, dióxido de cloro, ácido hipocloroso, hipoclorito de sódio e de cálcio), compostos não halogenados (ozônio, peróxido de hidrogênio), aldeídos, sais quaternários de amônio, entre outros (ANDRADE, 2008).

2.9 Novas estratégias

Várias alternativas aos métodos convencionais de uso de sanitizantes têm sido desenvolvidas. Entre estas, o uso de enzimas específicas, de biodispersantes e de organismos competidores tem sido objetos de estudo. Infelizmente, até o momento não podem ser considerados uma real alternativa ao uso de antimicrobianos químicos tradicionais.

A indústria de alimentos vive a constante preocupação de obter produtos mais seguros microbiologicamente e com vida útil maior, levando ao uso mais frequente de sanificação química (LANGSRUD et al., 2003). No entanto, estudos recentes demonstraram que o uso de determinados sanificantes por períodos muito longos, promove pressão seletiva contribuindo para a emergência de microrganismos resistentes a estes compostos em ambientes relacionados a alimentos (CLOETE, 2003). No futuro a resistência microbiana pode tornar-se grande desafio para as indústrias processadoras de alimentos.

Nas últimas décadas, produtos vegetais com atividade antimicrobiana ganharam especial interesse por causa da resistência aos antibióticos que alguns microrganismos têm adquirido (ESSAWI; SROUR, 2000), ao mesmo tempo, a sociedade ocidental está enfrentando a tendência do consumismo “verde” (SMID; GORRIS, 1999), desejando menos aditivos alimentares sintéticos e produtos com um menor impacto sobre o meio ambiente.

2.9.1 Óleos essenciais

Os metabólitos sintetizados pelos seres vivos são divididos em primários e secundários.

A biossíntese dos metabólitos secundários é realizada por rotas bioquímicas específicas do organismo, ocorrendo estreita relação entre essas e aquelas responsáveis pelos metabólitos primários. Compostos obtidos do metabolismo primário, como a glicose, são usados como precursores do metabolismo secundários (CASTRO et. al., 2004). Os metabólitos secundários são originados a partir de intermediários do metabolismo primário da glicose: o acetato (Acetil- CoA), ácido chiquímico, ácido mevalônico e metileritrol fosfato (DEWICK, 2002).

Os óleos voláteis derivam de duas rotas biossintéticas: via ácido chiquímico ou via acetyl-CoA/ácido mevalônico (Figura 3).

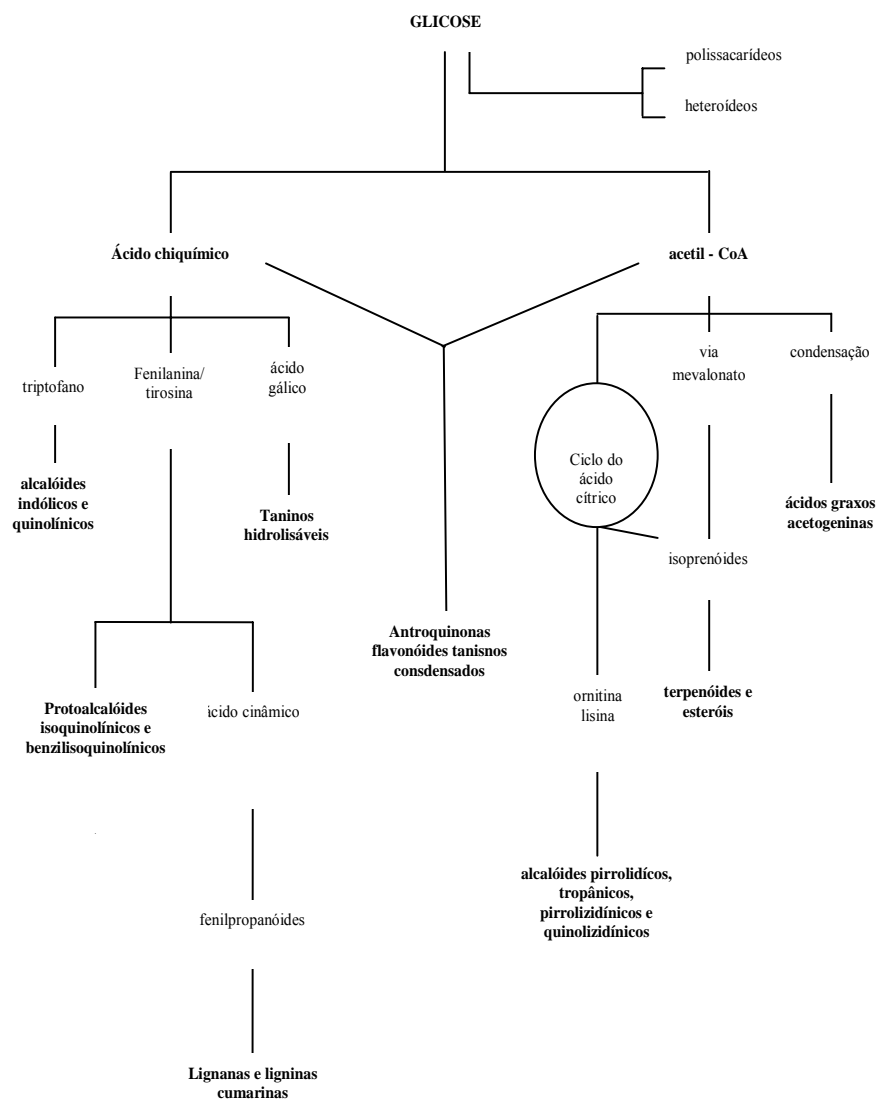


Figura 3 Vias metabólicas e substâncias sintetizadas a partir do metabolismo da glicose, no metabolismo secundário
 Fonte Simões e Spitzer (2004, p. 411)

Seus componentes constituem-se de fenilpropanoides (Figura 4), derivados da rota do ácido chiquímico, ou de terpenoides (Figura 5), derivados da rota acetil-CoA sendo que esses últimos surgem em maior quantidade (SIMÕES; SPITZER, 2004).

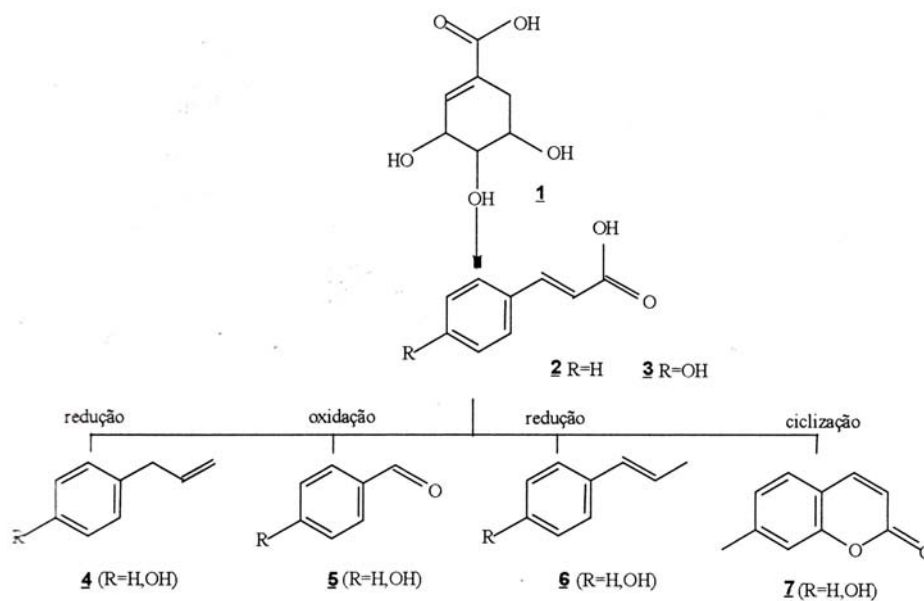


Figura 4 Formação de compostos fenilpropanoides
 Fonte Simões e Spitzer (2004, p. 469)

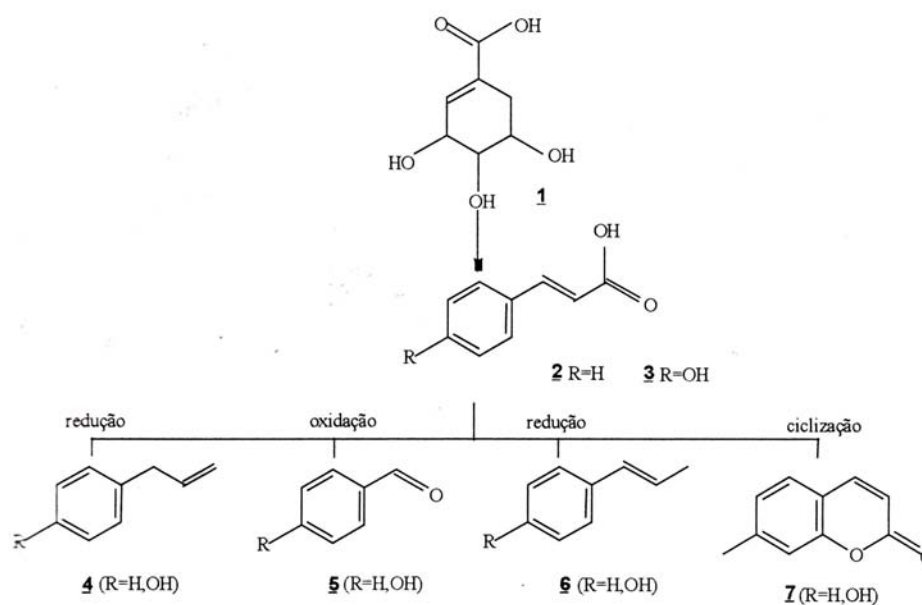


Figura 5 Biossíntese de terpenóides
Fonte Santos et al. (2004)

Na via do chiquimato, a fenilalanina, pela ação da fenilalanina amonialiase (PAL), elimina uma molécula de amônia, dando origem ao ácido cinâmico, precursor da maioria dos fenilpropanóides, compostos aromáticos com uma cadeia lateral, composta por três átomos de carbono, ligada ao anel aromático. A redução da cadeia lateral dos ácidos cinâmicos origina importantes substâncias presentes nos óleos essenciais, como o eugenol, o anetol e o safrol (SIMÕES; SPITZER, 2004). A rota biossintética do ácido chiquímico pode ser resumida a partir de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato (SANTOS et al., 2004).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanóides, preponderando os terpenóides (GONÇAVES et al., 2003; SILVA et al., 2003). São compostos orgânicos de estrutura química

heterogênea, e podem ser definidos como, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, líquidas, e podem ou não exalar odor (SARTORATTO et al., 2004).

Segundo Simões; Spitzer (2004), embora vários órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais (flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e semente), sua composição pode variar conforme a localização em uma mesma espécie.

Os óleos essenciais podem conter de 20 a 60, ou mais, compostos diferentes, nas mais variadas concentrações. São caracterizados por possuírem dois ou três componentes majoritários, em maior concentração, quando comparados com os demais compostos presentes somente em traços (BAKKALI et al., 2008).

Siqui et al. (2000) ressaltam que esses óleos essenciais estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos.

Óleos de plantas são usados com diferentes propósitos ao longo dos séculos (PERES, 2004). O estudo da atividade *in vitro* de óleos essenciais e seus constituintes sobre patógenos e bactérias deteriorantes têm sido realizado por diversos autores (BURT; REINDERS, 2003; DORMAN; DEANS, 2000; OLIVEIRA et al., 2010; OUSSALAH et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; SIQUI et al., 2000). Porém, os mecanismos de ação dos óleos essenciais ainda não foram totalmente elucidados. Dado o grande número de componentes químicos a atividade bacteriana tem sido atribuída a diversos mecanismos de atuação em vários alvos nas células (Figura 6) (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Geralmente os mecanismos de ação dos compostos naturais sobre a células são: a desintegração da membrana citoplasmática, a estabilização da força próton motriz (FPM), o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos

específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Os agentes antimicrobianos agem de forma indireta, através da interrupção do crescimento e permitindo o processo de distanciamento natural das células com as superfícies para a remoção do biofilme (CHEN; STEWART, 2000).

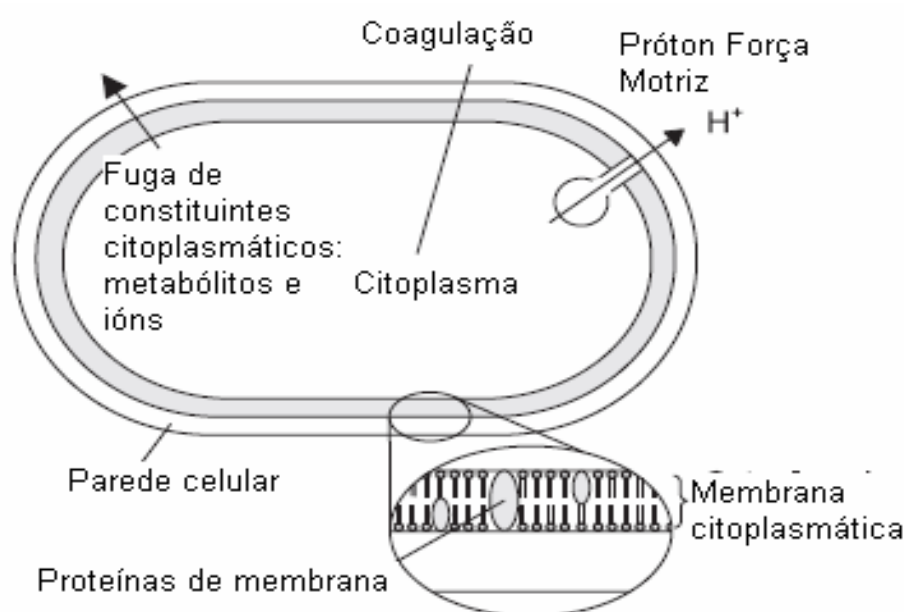


Figura 6 Ação do óleo essencial na célula
Fonte: Burt (2004)

2.9 *Elettaria cardamomum*

É uma planta perene com raízes laterais, que podem crescer até a altura de 2,4 metros, conhecida popularmente como cardamomo, cardamomo largo, pacova (SAJINA et al., 1997).

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

Elettaria cardamomum é uma espécie pertencente a família Zingiberaceae, originária da Índia e Sri Lanka.

O cardamomo possui em média 4% de óleos essenciais. Entre os componentes ativos encontra-se o α -terpineol, o cineol, o limoneno, o cabineno e o pineno (RÍOS et al., 2007). É utilizado na medicina popular com o efeito carminativo, estimulante da digestão, aliviando os espasmos intestinais e flatulência, e tem adquirido grande importância na indústria alimentícia e farmacológica (PUROHIT; VYAS, 2005; RÍOS et al., 2007).

Como especiaria o cardamomo é muito usado para dar sabor ao café, bolos, pães e *curry*, na Ásia, no Oriente Médio e na América Latina. Esta erva aromática é usada na culinária como agente flavorizante e aromatizante. (LEWIS, 1984; ROIGE MESA, 1945). As sementes possuem aroma agradável e gosto ligeiramente picante. O teor de óleo essencial nas sementes de *E. cardamomum* é fortemente dependente das condições de armazenamento e possui atividade antimicrobiana contra bactéria Gram-negativas e Gram-positivas (MAHADY et al., 2005).

2.10 *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon é um gênero importante da família *Poaceae* e é representado por cerca de 120 espécies e suas variedades, sendo que em torno de 100 espécies são encontradas em países tropicais. As espécies da família *Poaceae* são amplamente distribuídas em todo o mundo, especialmente nos países tropicais e subtropicais, podendo ser cultivadas em regiões montanhosas, de planície ou até mesmo em regiões áridas. São cultivadas em larga escala em

regiões tropicais do planeta em função de suas propriedades aromáticas (MARCO et al., 2007; NEGRELLE; GOMES, 2007).

Cymbopogon citratus é originária da Índia (NEGRELLE; GOMES, 2007), e conhecida popularmente com diferentes nomes: capim-limão, capim-santo, erva-cidreira, capim-catinga, capim de cheiro, capim-cidrão, capimecidrilho, capim-cidró e capim-ciri (COSTA et al., 2005). O *C. citratus* tem grande importância econômica na produção de óleo essencial (LORENZI; MATOS, 2003).

Cymbopogon citratus é uma planta aromática medicinal, possuindo aroma semelhante ao limão e sabor ardente (NEGRAES, 2003). Com base na medicina popular é utilizado como calmante, ministrado no preparo de chá a partir de suas folhas, analgésico em dores estomacais, abdominais e de cabeça, antifebril, antirreumático, carminativo, diurético, em distúrbios digestivos (COSTA et al, 2005).

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

Sua maior importância econômica consiste da obtenção do seu óleo essencial. A composição química do *C. citratus* varia, de acordo com a diversidade genética e o habitat (SANTOS et al., 2009). O principal constituinte é o citral, uma mistura dos isômeros geranial e neral e seu conteúdo variam entre 47% a 85% (ANDRADE et al., 2009; KASALI, OYEDEJI; ASHILOKUN, 2001; PINO; ROSADO, 2000; SIBIBE et al., 2001). Em menor proporção têm sido identificados outros componentes como o canfeno, citonelal, citronelol, farnesol, geraniol, limoneno, linalol, mentol, mirceno, nerol, a-pineno, b-pineno e terpineol (TESKE; TRENTINI, 1997). Entre os constituintes fixos encontram-se flavonoides saponinas e alcaloides (EVANS, 1996).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se a composição química e a tensão superficial dos óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* e *Cymbopogon citratus*, buscando correlacionar sua composição com a atividade antimicrobiana. A composição química dos óleos essenciais avaliados foi semelhante aos dados encontrados na literatura, com predominância de monoterpenos. Os óleos essenciais apresentaram baixa tensão superficial, demonstrando assim potencial aplicação como agente sanificante.

A necessidade deste estudo surgiu em função da falta de informações sobre a biotividade do óleo essencial de cardamomo, bem como, a escassez de trabalhos com óleos essenciais, no que se refere à atividade esporicida dos mesmos.

As superfícies de aço inoxidável AISI 304 utilizado, sem camada condicionante apresentou-se hidrofóbico e com camada condicionante hidrofílica. No entanto essa diferença não teve efeitos no processo de adesão de células vegetativas e endósporos de *B. cereus*.

Os óleos essenciais apresentaram bons resultados sobre células planctônicas e sésseis de *B. cereus*. Os resultados também foram satisfatórios sobre endósporos livres e aderidos.

REFERÊNCIAS

ABSOLOM, D. R. et al. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 90-97, July 1983.

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *B. cereus* emetic toxina (cereulide), in various foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 23-27, Feb. 2002.

ALTMAN, S. J. et al. Integration and decontamination of *Bacillus cereus* in *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxoford, v. 107, n.1, p. 287-299, Dec. 2009.

ANDERSSON, U.; RONNER, U.; GRANUM, P. E. What problems does the food industry have the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 145-155, Apr. 1995.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. das G. B.; LIMA, M. da D. Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, Dehradun, v.12, n. 1, p. 41-45, Oct. 2009.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. 400 p.

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

ANNOUS, B. A.; FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L. Quorum Sensing in Biofilms: Why Bacteria Behave the Way They Do. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 1, p 24- 37, Jan./Feb. 2009.

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

BAYER, M. E.; SLOYER, J. L. The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. **Journal of General Microbiology**, London, v.136, p. 867-874, May 1990.

BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: BHUNIA, A. K., (Ed.). **Foodborne Microbial Pathogens**. New York: J. Wiley and Sons, 2007. p. 135-148.

BRANDA, S.S. et al. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 3970–3979, June 2004.

BREYERS, J. D.; RATNER, D. B. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, New York, v.70, n. 5, p. 232–237, Jan. 2004.

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

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.36, n.3, p.162–167, 2003.

BUSSCHER, H. J. et al. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 980-983, Nov. 1984.

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

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: UFV, 2004. 113 p.

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

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

CHAVANT, P. et al. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 2, p. 728-737, Feb. 2002.

CHEN, X.; STEWART, P. S. Biofilm removal caused by chemical treatments. **Water Research**, New York, v. 34, p. 4229–4233, Dec. 2000.

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, p.22-32, Jan. 2003.

CLOETE, T. E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v 51, p. 277-282, June 2003.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, Out./Dez.2005.

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

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 4, p. 847–867, Dec. 2000.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. New York, J. Wiley and Sons, 2002, 507p.

DI BONAVENTURA, G. et al. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. **Folia Microbiologica**, Delft, v. 52, p. 86-90, Sept. 2007.

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

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, p. 881-900, Sept. 2002.

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

DUTRA, M. G. B. As múltiplas faces e desafios de uma profissão chamada Medicina Veterinária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, Ano 12, n. 37, p. 49-56, Apr. 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AGENCY – AHAW. **Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. The EFSA Journal**. <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/223r.pdf>> Acesso em 20 jan.2011.

ENEROTH, A. et al. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.68, p.189-196, May 2001.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 1 p. 117-126, Nov. 2003.

ESSAWI, T., SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.70, n.3, p. 343-349, June 2000.

EVANS, C. Orders and Families of Medicinal Plants. In: **Pharmacognosy**. 4 ed. UK: W B Saunders Company Ltda. 1996, 320 p.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BENEZECH, T.J. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.90, p.892–900, Feb. 2001.

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

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

GAYLARDE, C. C.; MORTON, L. H. G. Deteriogenic biofilms on buildings and theirs control: a review. **Biofouling**, Chur, v. 14, n. 1, p. 59-74, 1999.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. Agentes bacterianos de toxinfecções. IN: **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. São Paulo: Varela, 2003. Cap. 12, p. 215-220.

GIOVANNACCI, I. et al. Physicochemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from a pork-processing environment in relation to serotypes, genotypes and growth temperature. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n.6, p. 992-1000, June 2000.

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e Composição do óleo essencial de alfafaquina (*Ocimum sello*; Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, p. 8-14, 2003.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus*. In: DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTIVILLE, T. J. (Ed.). **Food Microbiology**: Fundamentals and Frontiers. 2 ed., Washington: ASM Press, 2001, p. 373-381.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, p. 61-66, 1994.

HAMON, M. A.; LAZAZZERA, B. A. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 42, p. 1199-1209, Apr. 2001.

HILBERT, L. R. et al. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, v. 52, p 175-185, Oct. 2003.

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

JOHNSON, K. M. *Bacillus cereus* food-borne illness- an update. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 47, n. 2, p. 145-153, 1984.

JOHNSON, K. M.; NELSON, C. L.; BUSTA, F. F. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrhea strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 286-287, 1983.

JULLIEN, C. et al. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. **Journal of Food Engineering**, Maryland Heights, v. 56, n. 1, p. 77-87, Mar. 2002.

KASALI, A. A.; OYEDEJI, A. O.; ASHILOKUN, A. O. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Flavour Fragrance Journal**, Bognor Regis, v. 16, p. 377-378, 2001.

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

KREPSKY, N. et al. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates. **Current Microbiology**, New York, v. 46, p. 280–286, 2003.

KUSE, M. et al. High incorporation of l-amino acids to cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, Toronto, v. 10, n 8, p. 735-739, Apr. 2000.

LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance – a change for the food industry. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 283-290, 2003.

LASPIDO, C. S.; RITTMANN, B. E. Modeling biofilm complexity by including active and inert biomass and extracellular polymeric substances. **Biofilms**, Reino Unido, v.1, p. 285–291, 2004.

LEWIS, Y. S. **Cardamom: Spices and herbs for the food industry**, 1 ed. U. K.: Food Trade Press, 1984; p 47-57.

LINDSAY, D. et al. A differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy associated *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* isolate. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 352-361, 2002

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 1ed. São Paulo: Plantarum, 2003, 576 p.

MAHADY, P. S. et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research**, London, v.19 n.11, p. 988–991, 2005.

MAFU, A. A. et al. Adhesion of pathogenic bacterial to food contact surfaces: Influence of pH of culture. **International Journal of Microbiology**, Stuttgart, v. 2011, p.1-10, Oct. 2010.

MARCO, C. A. et al. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3 p. 429-432, Sept. 2007.

MARK, C. et al. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p.1893–1897, 1987.

MAZUMDER, S. et al. Role of hidrophobicity in bacterial adhesion to carbon nanostructures and biofilm formation. **Biofouling**, Chur, v. 26, n.3 p. 333-339, 2010.

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

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

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

NOTERMANS, S. et al. Arisk assesment study of *Bacillus cereus* presente in pasteurized milk. **Food Microbiology**, London, v. 14, p 143-151, 1997.

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

OLIVEIRA, M. M. et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potencial. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 97-106, Jan/Mar. 2010.

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

- PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial attachment the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Hampshire, v.34, n. 9, p. 577-588, Sept. 2007.
- PARIZZI, S. Q. F. et al. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 77-83, Mar. 2004.
- PARSEK, M. R.; FUQUA, C. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n.14, p. 4427-4440, July, 2004.
- PAULUS, W. **Microbicides for the protection of materials**: a handbook. London: Chapman Hall, 1993,496 p.
- 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, May/June., 2008
- PERES, L. E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, 2004, P1-10.
- PINO, J. A.; ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 12, p. 301-2, 2000.
- POIMENIDOU, S. et al. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current Science**, Columbus, v. 85, n. 9, p. 1299-1307, Nov. 2003.
- PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilm: a survival strategy of bacterial. **Current Science**, Columbus, v.85, n. 9, p.1299-1307, Nov. 2003.
- PUROHIT, S.S.; VYAS, S.P. **Medicinal plant cultivation**: A scientific approach. India: Agrios, 2005, 624p.
- RAJKOWSKI, K. T.; BENNETT, R. W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M. D.; BIER, J. W. (Ed.) **International Handbook of Foodborne Pathogens**, New York: CRC, 2003. p. 27-39.

RAZATOS, A. et al. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. **Applied Biological Science**, Hiroshima, v, 95, p. 11059-11064, 1998.

REAL, G.; HENRIQUES, A. O. Controlo da iniciação da esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 68, p. 2-12, 2001.

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

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

ROIGE MESA, J. T. **Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de cuba**. Habana: Ministério de Agricultura, 1945. 842 p.

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

RYU, J. H.; BEAUCHAT, L. R. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxid, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n.12, p. 2614-2622, 2005.

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

SANSEBASTIANO, G.; ZONI, R.; BIGLIARDI, L. Cleaning and Disinfection Procedures in the Food Industry General Aspects and Practical Applications. In: SANSEBASTIANO, G.; ZONI, R.; BIGLIARDI, L. (Eds). **Food Safety**. US: Springer, 2007. p. 253-280.

SANTOS A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorcimento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.19, p. 436-441, 2009.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais em Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório.

Comunicado Técnico 99. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. p. 01-06. 2004.

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

SERRANO, M. et al. Comunicação inter-celular durante a esporulação em *Bacillus subtilis*. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 70, p. 22-32, 2001.

SCHELDEMAN, P. et al. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1480–1494, 2005.

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

SIDIBE, L. et al. Aromatic plants of Mali (IV): Chemical composition of; essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *C. giganteus* (Hochst.) Chiov. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 13, p. 110-120, 2001.

SILVA, A. F. I. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L) POIT. (LAMIACEA). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, p. 1-7, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. p. 467-495.

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

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

SIQUI, A. C. et al. Óleos Essenciais-Potencial antiinflamatório, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento. Química Nova*, São Paulo, v. 16, p.38-43, 2000.

SMID, E.J., GORRIS, L.G.M. Natural antimicrobials for food preservation, In: RAHMAN, M.S. (Ed.). **Handbook of Food Preservation**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.285-308.

SOUZA, V. C. **Botânica sistemática**: Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira. baseado em APG II/ LIMA, V. C.; LORENZI, H. SP: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2005, 640 p.

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

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium, 1997. p. 75-76.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Journal of Science and Technology**, Songkhla, v. 25, p. 807-815, Nov./Dec.2003.

VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R. SÁNCHEZ, S. R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 50, p. 61-66, 2002.

VALERO, M. et al. Modeling the influence of electron beam irradiation on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Food Microbiology**, London, v. 23 n. 4, p. 367-371, Jul. 2006.

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

WEBB, J. S.; GIVSKOVY, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 578-585, 2003.

WIMPENNY, J. W. T. An overview of biofilms as functional communities. In: ALLISON, D. G. et al. (Ed) **Community Structure and Cooperation in Biofilms**. Cambridge: University Press, 2001. p. 1-24.

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**, Ames, v.59, n.7, p.727-733, July 1996.

XIAOQI, Z.; BISHOP, P. L.; KUPFERLE, M. J. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. **Water Science and Technology**, London, v. 37, n. 4, p. 345–348, 1998.

**CAPÍTULO 2 PROPRIEDADES BACTERICIDA E ESPORICIDA DE
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Elettaria cardamomum* E *Cymbopogon citratus*
SOBRE *Bacillus cereus***

RESUMO

A demanda de disponibilidade de novos compostos ou misturas deles com ação antimicrobiana vem crescendo, uma vez que os microrganismos de importância tanto na área médica quanto na indústria alimentícia têm se mostrado cada vez mais resistentes aos sanificantes químicos disponíveis no mercado. Objetivou-se neste estudo identificar os constituintes químicos e a tensão superficial dos óleos essenciais de *Elettaria Cardamomum* e *Cymbopogon citratus*, avaliar a atividade bactericida e esporicida dos óleos essenciais sobre *Bacillus cereus*. A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massa. A tensão superficial foi medida pelo método da gota pendente em goniômetro. A atividade antimicrobiana de diferentes concentrações dos óleos essenciais, puros e em combinação, foi determinada pela técnica de disco-difusão para célula vegetativa e diluição em caldo para endósporos. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) encontradas foram utilizadas no tempo de ação bactericida e esporicida. Para o óleo essencial de *C. citratus* foi encontrado entre os componentes o geranial e neral. O óleo essencial de *E. cardamomum* continha α -pineno e 1,8 cineol. Ambos os óleos essenciais testados apresentaram baixa tensão superficial. A maioria das concentrações testadas apresentou-se efetiva contra células vegetativas e endósporos de *B. cereus*, demonstrando efeito bactericida e esporicida nos tempos avaliados. Os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus*, puros e em combinação, demonstraram potencial de aplicabilidade com sanitizantes, devido sua ação antibacteriana, esporicida, bem com, sua baixa tensão superficial.

Palavras-chave: Cardamomo. Capim limão. Atividade bactericida. Atividade esporicida.

ABSTRACT

The use of natural products capable of replacing chemical compounds in the food industry has been an option for those who seek health and food safety. As such, this work's goal was to determine the chemical compositions, superficial tensions, and to evaluate both bactericidal and sporicidal potential of *Elettaria Cardamomum* and *Cymbopogon citratus* essential oils. Qualitative analysis was conducted through gas chromatography coupled with mass spectrometry. Superficial tensions were measured through the pendant drop method, using a goniometer. The bacteriostatic effects of different essential oil concentrations, both individually and combined, were determined through disc diffusion -for vegetative cells-, and broth dilution for endospores. Minimal inhibitory concentrations (MIC) found were employed at the time of the bactericidal and sporicidal actions. Among the components found on *C. citratus* essential oil, geranial and neral were found. *E. cardamomum* oil presented α -pinene and 1,8 cineol. Both tested essential oils presented low superficial tensions, and the majority of concentrations tested proved themselves effective against *B. cereus* vegetative cells and endospores at the assessed times. The essential oils of *E. cardamomum* and *C. citratus*, both individually and combined, demonstrated potential applicability as sanitizers, due to their antibacterial and sporicidal actions, as well as their low superficial tensions.

Keywords: *Bacillus cereus*. *Elettaria cardamomum*. *Cymbopogon citratus*.
Antibacterial activity. Antiesporicidal activity.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias produtoras de endósporos estão entre as principais responsáveis por problemas de deterioração na indústria de alimentos. *Bacillus* é amplamente disseminado no ambiente, podendo contaminar desde matérias-primas a alimentos processados, promovendo diferentes alterações (PIRHONEN et al., 2005; VALERO et al., 2002). *Bacillus cereus* além de causar deterioração é frequentemente associado a doenças de origem alimentar. Nos últimos anos, os surtos relacionados a esse microrganismo têm adquirido maior importância, sobretudo em países industrializados (BORGE et al., 2001; PIRHONEN et al., 2005). Esse fato advém de problemas como manipulação inadequada dos alimentos, de deficiências nos processos de higienização e aumento da resistência microbiana aos agentes sanitizantes.

Sanitizantes à base de diferentes compostos antimicrobianos vêm sendo utilizados na indústria de alimentos para reduzir a níveis seguros os microrganismos presentes, evitando assim, a contaminação dos produtos processados (ANDRADE, 2008). No entanto, pesquisas demonstram que quando tratamentos químicos são realizados por períodos prolongados, ocorre o aumento da resistência bacteriana a esses compostos, as bactérias se adaptam e se tornam tolerantes aos agentes antimicrobianos (LANGSRUD, et al., 2003).

A atividade antimicrobiana de substâncias obtidas a partir do metabolismo secundário de plantas tem sido pesquisada em diversas espécies, tanto no Brasil quanto em outros países, entre estas substâncias estão óleos essenciais (LOGUERCIO, et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010). Óleos essenciais são compostos voláteis, aromáticos, oriundos do metabolismo secundários das plantas aromáticas, cuja composição química pode variar sendo influenciada pela diversidade genética e fatores ambientais (CARDOSO et al., 2000).

A aplicação de óleos essenciais e seus componentes vêm ganhando espaço e sendo objeto de pesquisa e aplicação em várias áreas, entre elas a indústria alimentícia. Isso se deve ao apelo natural dos compostos e por apresentarem propriedades importantes, como a atividade antioxidante e antimicrobiana (SACCHETTI et al., 2005).

Atualmente os consumidores têm demonstrado maior interesse em consumir produtos naturais, assim, a comunidade científica vem buscando conservantes que possam ser utilizados nos alimentos, mantendo-os saudáveis aos olhos dos consumidores (SOUZA et al., 2005). Entre as espécies produtoras de óleos essenciais têm-se o cardamomo (*Elettaria cardamomum*) e o capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DF) Stapf).

Elettaria cardamomum é uma planta da família *Zingiberaceae*, cujas sementes são comumente usadas como condimento na Índia desde a antiguidade (RAVINDRAN, 2002). As sementes e o óleo essencial são usados como componentes aromatizantes em grande variedade de alimentos. Sementes de *E. cardamomum* apresentam atividade antibactericida comprovadas contra bactérias Gram-negativas (MAHADY et al., 2005). Sendo essa atividade atribuída aos compostos 1,8-cineol, α - terpinil acetato e ao limoneno (VERBEL et al., 2010)

A espécie *Cymbopogon citratus* é uma planta aromática e medicinal pertencente à família *Poaceae*, originária da Índia, conhecida por fornecer óleo essencial rico em citral (ANDRADE; ZOGHBI; LIMA, 2009). A composição e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de capim limão foram avaliadas por Oliveira et al. (2010) que observaram, dentre seus três principais componentes, α -citral (geranial) e o β -citral (neral) e o geraniol. Nesse mesmo estudo a atividade antimicrobiana do óleo essencial sobre *Listeria monocitogenes* foi demonstrada.

A partir do exposto anteriormente, este trabalho teve como objetivos determinar a composição química, a tensão superficial e a ação biológica individual de diferentes concentrações dos óleos essenciais de cardamomo (*E.cardamomum*), capim Limão (*C. citratus*) e o sinergismo entre eles sobre cepa de *Bacillus cereus* ATCC14579.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de execução do experimento

A determinação qualitativa dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) e a avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos (DCA), ambos localizados na UFPA. A tensão superficial dos óleos foi determinada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* foram adquiridos da FERQUIMA Ind. e Com. LTDA.

2.2.1 Caracterização química dos óleos essenciais

A caracterização qualitativa dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se o aparelho Shimadzu CG-17A, equipado com detector seletivo de massa modelo QP 5000A sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB-5MS (0,25 µm de espessura de filme); temperatura do injetor de 280°C; programação da coluna com temperatura inicial de 50°C, sendo acrescidos 4°C a cada minuto até atingir 200°C; gás carreador hélio (1mL.min⁻¹); taxa de split 1:83; volume

injetado de 1 μL (1% de solução em diclorometano) e pressão inicial na coluna de 100,2 KPa. As condições de EM foram: energia de impacto de 70 e V; velocidade de decomposição 1000; intervalo de decomposição de 0,50; e fragmentos de 45 Da e 450 Da decompostos. Injetou-se, nas mesmas condições das amostras, uma série de padrões de hidrocarbonetos (C_9H_{20} $\text{C}_{26}\text{H}_{54}$). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovat's, calculado para cada constituinte (ADAMS, 2007).

2.2.2 Tensão superficial dos óleos essenciais

A tensão superficial dos óleos essenciais foi medida em goniômetro (Kruss®, Alemanha), por meio do método da gota pendente, (BEHRING et al. 2004). Por esse método, uma gota do líquido fica presa à seringa do goniômetro onde as medidas de largura e altura são usadas para o cálculo da tensão superficial.

Foram utilizadas 10 gotas de cada óleo e posteriormente desprezadas em recipiente de vidro. Uma gota foi formada com 1 μL do óleo e foram medidas suas dimensões. Os resultados foram expressos em mN/m (miliNewtons por metro). Etanol 70% (v/v) e água destilada foram utilizados para lavagem da seringa. Antes de cada medida, foi desprezado o volume de 1 mL inicial para que se tivesse certeza que somente a substância estudada estava presente. Todas as medições foram realizadas em ambiente com temperatura de aproximadamente 25°C.

2.3 Microrganismo

Foi utilizada a cepa de *Bacillus cereus* ATCC 14579, adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, em Campinas, SP, Brasil. Foi utilizada esta estirpe devido o conhecimento da sua potencialidade em formar biofilme.

2.3.1 Padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa

A cultura liofilizada de *B. cereus* ATCC 14579 foi reativada em Erlenmeyer contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) (Acumedia®, Lansing, Michigan, EUA) e incubada a 37 °C por 24 horas. O processo de reativação foi realizado por três vezes consecutivas. O inóculo foi estriado no meio seletivo diferencial *Bacillus cereus* Agar Base (PEMBA) (Biolife®, Milan, Italy) adicionado de suplemento *Bacillus Cereus Selective Supplement*. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a padronização do número de células, a partir da cepa ativada, foi transferida uma alçada para Erlenmeyer contendo 150 mL de BHI. Foram realizadas leituras periódicas da absorbância da cultura a 600 nm. Em seguida foram feitas diluições seriadas em água peptonada 0,1 % (p/v) com posterior plaqueamento em superfície, utilizando-se como meio Agar Triptona de Soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia), as placas foram incubadas a 32 °C por 24 horas.

Durante todo o experimento, a cepa foi estocada em meio de cultura para congelamento (15 mL de glicerol; 0,5g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 100 mL de água destilada; pH 7,2 ±2). A cultura estoque foi reativada pela transferência de alíquotas para tubos de ensaio contendo BHI, com auxílio de alça de repicagem. Foram realizados três repiques

consecutivos com incubação a 32 °C por 24 horas, neste meio de cultura. Após a última repicagem, uma alçada foi retirada e transferida para Erlenmeyer contendo 150 mL de BHI, o qual foi incubado a 32 °C, até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento, aproximadamente 8,31 Log UFC.mL⁻¹ (OD_{600nm}=0,856).

2.3.2 Padronização, estocagem e preparo do inóculo do endósporo

Para obtenção dos endósporos, a cultura estoque de células vegetativas de *B. cereus* foi reativada três vezes consecutivas em Ágar Nutriente inclinado, incubado a 32 °C por 24 horas. Após esse procedimento, foi obtida uma suspensão de células vegetativas, pela adição de água destilada estéril e agitação manual. Em seguida, esta suspensão foi inoculada em Erlenmeyer contendo meio de esporulação líquido (3 g de extrato de carne, 5g de triptona, 1 g de amido, 10mg de sulfato de manganês, 1000 mL de água destilada) (MORAES, 1997) e incubado a 32 °C por 144 horas. Para a padronização do número de endósporos, foram realizadas leituras periódicas da absorbância a 600 nm. Simultaneamente foi feita observação ao microscópio de luz dos endósporos, utilizando a técnica de coloração de Wirtz-Conklin. Essa técnica utiliza uma solução de corante Verde Malaquita 5% (m/v), e como contracorante a Safranina 0,5% (m/v). Sendo que os endósporos adquirem coloração verde intenso, enquanto outras estruturas cor rosa (Figura 2). Uma vez verificado que as células vegetativas encontravam-se na forma de endósporos, foi feita a contagem. Para aferir o número do Log Endósporos. mL⁻¹, a suspensão foi submetida a choque térmico (80 °C/ 10 minutos) e foram feitas diluições seriadas em água peptonada 0,1 % (p/v). e plaqueamento em superfície, em Agar TSA, com incubação a 32 °C por 24 horas. O inóculo foi padronizado em 5,36 Log endósporo.mL⁻¹ (OD_{600nm}=0,615).

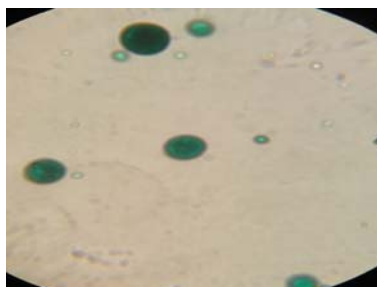


Figura 1 Endósporos de *B. cereus* corados pela técnica Wirtz-Conklin (aumento1000X)

2.4 Ação bacteriostática

A concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais foi determinada pela técnica de Disco-Difusão conforme NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com modificações. Foi adicionada alíquota da suspensão padronizada de *B.cereus* ao meio de cultura TSA, a 45 °C, obtendo-se uma concentração final de 7,31 Log UFC.mL⁻¹. A mistura foi homogeneizada e vertida imediatamente em placas de Petri.

Os óleos essenciais foram diluídos em etanol 95% P.A, obtendo as seguintes concentrações (µL/mL): 1000, 500, 250, 125, 63, 31, 15, 8, 4. Após a deposição de discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro sobre o meio inoculado e solidificado foram dispensados 5 µL dos óleos essenciais das diferentes concentrações. As placas foram incubadas em BOD a 32 °C, por 24 horas. O controle negativo foi preparado usando somente o solvente (etanol), e o controle positivo foi preparado com Cloranfenicol 1000 µL/mL. A CMI foi avaliada utilizando-se paquímetro para a medição dos halos de inibição em mm. Todo procedimento foi realizado em triplicata e com três repetições.

O efeito bacteriostático foi caracterizado pelo comprometimento do crescimento bacteriano e formação de halo de inibição. A menor concentração de óleo essencial que apresentou efeito bacteriostático foi definida como CMI.

2.4.1 Inibição da germinação do endósporo (ação esporostática)

Foi empregado o método de diluição em caldo para medida quantitativa da atividade *in vitro* do agente antimicrobiano sobre isolado bacteriano. Prepararam-se tubos de ensaio com meio de cultura aos quais foram acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos foram inoculados com a suspensão padrão de esporos de *B. cereus*. Após incubação de 24 horas, foi feita a comparação visual dos tubos. A Concentração Inibitória Mínima (CMI), neste caso, foi definida como a menor concentração do agente antimicrobiano que impede o crescimento visível da bactéria (NCCLS, 2003).

Foram utilizadas séries de onze tubos de ensaio, adicionados de 1 mL de meio de cultura BHI e 0,5% de Tween 80, para cada tubo exceto para o primeiro. Os tubos foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Para obtenção de concentrações decrescentes de óleos, foram adicionados 2 mL de óleos essenciais no primeiro tubo (tubo vazio), do qual 1 mL foi transferido para o segundo tubo, contendo 1 mL de BHI, foi homogeneizado com agitador tipo vórtex e o procedimento foi repetido sucessivamente até o tubo de número 9. Desse modo, foram obtidas as seguintes concentrações aproximadas de óleo essencial expressas em µL/mL: 1000 (tubo 1), 500 (tubo 2), 250 (tubo 3), 125 (tubo 4), 63 (tubo 5), 31 (tubo 6), 15 (tubo 7), 8 (tubo 8), 4 (tubo 9). A cada tubo foram adicionados 200µL da suspensão padronizada do endósporo, previamente submetida a choque térmico, obtendo-se a concentração final de 4,36 Log UFC. mL⁻¹. O tubo de número 10 foi considerado o controle negativo (BHI + Cloranfenicol+ endósporos) e o tubo de número 11 o controle positivo (BHI + endósporo). O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados a 32 °C por 24

horas. A CMI dos óleos essenciais foi considerada como a concentração do tubo de maior diluição onde se verificou a ausência de crescimento.

2.4.2 Tempo de ação bactericida

O tempo necessário para ação bactericida do óleo foi determinado utilizando a CMI previamente determinada. Foram adicionados 200 μL do inóculo na concentração final de 7 Log UFC. mL^{-1} a tubos de ensaio contendo 2 mL de soluções à base de óleos essenciais e solução controle. As soluções sanitizantes foram elaboradas adicionando diferentes quantidades de óleos essenciais acrescidas de solução salina (NaCl) 0,85% (v/v) contendo 0,5% (v/v) de Tween 80 (Quadro1).

Quadro 1 Composição das soluções à base de óleos essenciais e solução controle utilizadas na determinação do tempo bactericida, (A) *E. cardamomum*, (B) *C. citratus*, (C) combinação e (D) Controle

Solução	Solução Salina (0,5% Tween 80) ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>E. cardamomum</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>C. citratus</i> ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Total (μL)
A	984	16	0	1000
B	992	0	8	1000
C	996	2	2	1000
D	1000	0	0	1000

As células vegetativas foram expostas às soluções sanitizantes por: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após cada tempo de contato alíquotas de 100 μL foram retiradas e plaqueadas em Agar TSA em duplicata e com três repetições. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 32 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O tempo de ação bactericida foi definido como o primeiro tempo de contato, que promoveu ausência total de crescimento bacteriano, representado pela formação de colônias visíveis na superfície do TSA.

2.4.3 Tempo de ação esporicida

O tempo necessário para ação esporicida do óleo foi determinado utilizando-se do CMI. Foram adicionados, 200 μL do inóculo de endósporos na concentração final de 4 Log UFC. mL^{-1} a tubos de ensaio contendo 2 mL de solução à base de óleos essenciais e solução controle. As soluções sanitizantes, foram elaboradas adicionando diferentes quantidades de óleos essenciais acrescidas de solução salina contendo 0,5% (v/v) de Tween 80 (Quadro1).

As células vegetativas foram expostas a soluções sanitizantes por: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Após cada tempo de contato alíquotas de 100 μL foram retiradas das soluções sanitizantes, plaqueadas em TSA e incubadas a 32 $^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Todo procedimento foi realizado em duplicata e três repetições. O tempo de ação esporicida foi definido como o primeiro tempo de contato, que promoveu ausência total de crescimento bacteriano, representado pela formação de colônias visíveis na superfície do TSA.

2.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 9 (óleos essenciais e sua combinação x concentração), com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott e Knott, a 5% de probabilidade, e análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 5.1 (Ferreira, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química dos óleos essenciais

Na Tabela 1 verifica-se a composição dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* utilizados. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles encontrados na literatura. Ambas amostras apresentaram em sua composição monoterpenos. Segundo Bakkali et al. (2008) esses são altamente voláteis e são considerados os mais representativos da composição dos óleos essenciais (cerca de 90%). Os monoterpenos são classificados em hidrocarbonetos, formados apenas por carbono e hidrogênio, como mirceno, sabineno, α -pineno, ou oxigenados com várias funções como linalol e α -terpineol (álcoois), geranial, geraniol e neral (aldeídos), e 1,8-cineol (éteres).

Tabela 1 Constituintes químicos dos óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* e *Cymbopogon citratus*

<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf
α pineno	Mirceno
1,8 cineol	Neral
Sabineno	Geranial
Mirceno	Geraniol
Limonene	Linalol
terpinen-4-ol	(Z) β -ocimeno
α -terpinyl acetate	(E) β -ocimeno
α terpineol	

Resultados obtidos por CG e EM

Embora neste estudo os componentes dos óleos essenciais não tenham sido quantificados, pode se dizer, com base em estudos realizados por Furlan et al. (2010) e Oliveira et al. (2010), que a composição química do óleo essencial de *C. citratus* utilizado nesse trabalho foi semelhante aos obtidos pelos autores os quais encontram como os constituintes majoritários, o neral, o geranial e

geraniol. Porém Pereira et al. (2008) e Santin et al. (2009) encontraram neral, geranial, mirceno. Neste estudo todos os componentes estavam presentes.

Os dados comparativos na literatura sobre composição do *E. cardamomum* são raros. No entanto, Marongiu; Piras; Porcedda (2004) encontraram como componentes majoritários α -terpinyl acetato, 1,8-cineol, linalyl acetato, limoneno e linalol, enquanto Verbel et al. (2010) o 1,8-cineol, e o α -terpinyl acetato.

Variações na composição e quantidade dos constituintes dos óleos essenciais podem ser atribuídas a diferentes fatores como exemplo: espécie da planta, a origem, a parte da planta utilizada, o estágio de desenvolvimento, as condições ambientais e de crescimento como: o solo e as condições de coleta e estocagem (DAFERERA; TARANTILIS; POLISSIOU, 2002).

3.2 Determinação da tensão superficial dos óleos essenciais

A tensão superficial é a propriedade físico-química que rege a capacidade da solução em penetrar na superfície promovendo melhor desinfecção desta. Essa tensão se encontra na superfície dos líquidos e se comporta como uma película, fazendo com que uma gota do líquido se concentre ou espalhe quando em contato com a superfície. Quanto menor o valor desta tensão superficial, maior será a capacidade da solução química em penetrar na superfície, melhorando a capacidade de molhamento (GIARDINO et al., 2006). Na Tabela 2 são apresentados os resultados da tensão superficial dos óleos essenciais avaliados neste estudo.

Tabela 2 Tensão superficial de óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus*

Óleos essenciais	Tensão superficial (mN/m)
<i>E. cardamomum</i>	29,86±0,25
<i>C. citratus</i>	32,33±2,20
Combinação (1:1)	30,22±1,50

Os baixos valores de tensão superficial encontrados confirmam o comportamento hidrofóbico dos óleos estudados. Tem-se como padrão de maior e menor tensão superficial respectivamente, a água (72 mN/m) (MILANO; KOLLING; FACCHIN, 1983) e o etanol (22 mN/m) (PÉCORIA; GUIMARÃES; SAVIOLI, 1991). Assim, os óleos estudados possuem maior solubilidade em etanol do que na água. Para diluição do óleo essencial na água é necessário o uso de agentes surfactantes que diminua a tensão superficial da água, no caso desse estudo foi utilizado Tween 80.

A capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais permite que estes sejam utilizados como agentes bactericidas/bacteriostáticos naturais na indústria de alimentos. Dessa forma, a concentração mínima inibitória (CMI) é utilizada para determinar a menor concentração com efeito bacteriostático para compostos antimicrobianos utilizados na indústria de alimentos. Burt, (2004) cita a CMI como método para avaliar o desempenho antimicrobiano de óleos essenciais.

Na Tabela 3 pode-se observar que os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* apresentaram efeito bacteriostático sobre cepas de *B. cereus* na maioria das concentrações avaliadas. Observou-se, porém, que a efetividade dos mesmos foi dependente da concentração em que foram utilizados. De acordo com análise de variância realizada a partir dos resultados obtidos pelo método Disco-Difusão, houve interação significativa ($P < 0,05$) entre os óleos essenciais e as diferentes concentrações utilizadas. Assim realizou-se o desdobramento dos óleos essenciais dentro de cada nível de concentração.

Tabela 3 Diâmetro médio dos halos de inibição formados devido à ação de diferentes concentrações de óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* individual e em combinação, sobre *Bacillus cereus*

Concentrações $\mu\text{L}/\text{ml}$	Óleos essenciais		
	<i>Elettaria Cardamomum</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	Combinação
0	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
4	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,32±0,25 ^b
8	0,00±0,00 ^a	0,92±0,067 ^a	4,75±0,87 ^c
16	0,90±0,10 ^a	1,06±0,06 ^a	5,57±0,87 ^d
31	1,00±0,60 ^a	1,60±0,64 ^b	5,72±1,13 ^d
63	1,04±0,04 ^a	2,20±0,12 ^b	5,99±0,52 ^d
125	1,18±0,15 ^a	3,28±0,99 ^b	6,09±0,28 ^d
250	1,52±0,46 ^a	6,88±1,07 ^c	8,14±1,89 ^d
500	1,99±0,47 ^b	11,69±2,80 ^d	13,88±3,70 ^e
1000	3,03±0,070 ^b	20,12±0,86 ^c	23,24±0,94 ^f

Resultados expressos pela média do diâmetro dos halos de inibição dado em milímetros (mm) \pm o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott, a 5% de probabilidade

Avaliando a ação bacteriostática de cada óleo essencial, as concentrações de 250, 125, 63, 31, 16, 8, 4 e 0 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, do óleo essencial de cardamomo, não diferiram entre si ($P < 0,05$). Já para o óleo de capim-limão houve diferença significativa a partir da concentração de 31 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ e para a combinação deles a partir de 4 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. Os óleos essenciais quando em combinação promoveram a formação de maior halo de inibição em todas as concentrações testadas em relação aos halos dos óleos essenciais testados individualmente, demonstrando assim a ação sinérgica dos mesmos. Burt (2004) afirma que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode estar relacionada ao efeito sinérgico entre os constituintes do mesmo.

Como pode ser observado na Tabela 4, a ação esporostática de cada óleo essencial não houve crescimento visível a partir das concentrações de 31 e 16 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ para os óleos essenciais de cardamomo e capim-limão, respectivamente. A ação esporostática do óleo essencial de cardamomo se deu a partir da concentração de 31 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ e para o capim-limão a partir da concentração de 16 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. Os óleos essenciais quando em combinação

inibiram o crescimento a partir da concentração de 8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ demonstrando assim maior efeito esporostático comparado a utilização individual de cada óleo.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de folhas de urucum e de açafrão também teve maior efetividade no momento em que os óleos foram combinados (CAIXETA, 2010).

Tabela 4 Tubos com ausência ou presença de crescimento de *B. cereus* em função das diferentes concentrações de óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* e sua combinação

Concentrações $\mu\text{L/mL}$	Tubos em cada série do método de diluição em caldo		
	<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	Combinação
0	+	+	+
4	+	+	+
8	+	+	-
16	+	-	-
31	-	-	-
63	-	-	-
125	-	-	-
250	-	-	-
500	-	-	-
1000	-	-	-

Resultado expresso pela presença de crescimento visível (+) ou ausência de crescimento visível (-)

Este trabalho confirma estudos anteriores que mostram a ação esporostática de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas (LAWRENCE; ENZO, 2009; PERIAGO et al., 2006). A descoberta de que os óleos essenciais estudados mantêm a sua atividade esporostática após considerável diluição é observação importante, aumentando assim o seu potencial de utilização na indústria.

Segundo Pereira et al. (2008) a combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas pode representar alternativa para potencialização da sua ação, sendo o aumento da atividade de compostos ou fatores, quando

aplicados em conjunto, comparados à sua atividade quando utilizados individualmente é denominado sinergismo (CEYLAN; FUNG, 2004).

Óleos essenciais de cardamomo e capim-limão apresentam diferentes ações antibacterianas, isso pode ser relacionado à concentração e a natureza de seus constituintes químicos. Essa atividade pode estar ligada à natureza lipofílica dos óleos essenciais, que lhes permite atravessar a parede celular e a membrana plasmática, rompendo a estrutura da parede de diferentes polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, tornando-os permeáveis. Em bactérias, essa permeabilidade está associada à perda de íons e do potencial de membrana, bem como o colapso da bomba de potássio e o sistema de ATP (DI PASQUA et al., 2006; TURINA et al., 2006; ULTEE et al., 2000, ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002).

Iscan et al. (2002) relacionaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais à presença de monoterpenos oxigenados em sua constituição. Os monoterpenos, devido ao caráter lipofílico, se deslocam da fase aquosa em direção as estruturas de membrana. O acúmulo dos compostos oxigenados na membrana plasmática ocasionaria perda de ATP pelos microrganismos, promovendo o rompimento da membrana celular dos mesmos.

Os métodos de Disco-Difusão e Diluição em Caldo mostram o potencial bacteriostático da maioria das concentrações dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* individuais e em combinação. No entanto, para as concentrações dos óleos essenciais com bom efeito antimicrobiano, ensaio adicional foi realizado para determinar o tempo necessário para que o efeito bactericida e/ou esporicida ocorresse (Tabela 5).

Tabela 5 Crescimento de células vegetativas e germinação de endósporos de *B. cereus* em função dos diferentes tempos de contatos da solução sanitizante à base de óleos essenciais na concentração determinada pela CMI

Tempo (minutos)	<i>E. cardamomum</i>		<i>C. citratus</i>		Combinação		Controle	
	Célula vegetativa	Endósporos	Célula vegetativa	Endósporos	Célula vegetativa	Endósporos	Célula vegetativa	Endósporos
0	+	+	+	+	-	+	+	+
5	+	+	+	+	-	-	+	+
10	+	+	-	-	-	-	+	+
15	-	-	-	-	-	-	+	+
20	-	-	-	-	-	-	+	+
30	-	-	-	-	-	-	+	+
40	-	-	-	-	-	-	+	+
50	-	-	-	-	-	-	+	+
60	-	-	-	-	-	-	+	+

Resultado expresso pela presença de crescimento visível (+) ou ausência de crescimento visível (-).
O inóculo se manteve viável durante todo o período analisado (60minutos)

A ação do óleo essencial se estende durante todo o tempo de contato com o microrganismo, melhorando assim a atividade antimicrobiana do mesmo. Assim, quanto maior o tempo de contato da solução sanitizante à base de óleo essencial, maior será a capacidade do mesmo de se deslocar em direção à célula bacteriana, afetando assim seu funcionamento.

4 CONCLUSÃO

Foram encontrados dentre vários compostos, 1,8 cineol e α pineno para o óleo essencial de *E. cardamomum* e neral e geranial para óleo essencial de *C. citratus*.

Os óleos essenciais apresentaram baixa tensão superficial, apresentando potencialidade para uso como agente sanificante.

Os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* e sua combinação mostraram ação esporicida e bactericida contra *B. cereus*, na maioria das concentrações utilizadas. A combinação demonstrou potencial ação sinérgica.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils componentes by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4 ed Carol Stream: Allured Publish, 2007. 840p.
- ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LIMA, M. D. Chemical composition of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf cultivated in North of Brazil. **Journal Essential Oil Bearing Plants**, Dehradun, v.12, n.1, p. 41-45, Oct. 2009.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. 400p .
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, Feb 2008.
- BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação do método do peso da gota para determinação da tensão superficial: Um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 492-495, May/June2004.
- BORGE, G. A. et al. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 237-246, Sept. 2001.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods: a review. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, p. 223-253, Aug. 2004.
- CAIXETA, D. S. **Ação de óleos essenciais de *Curcuma longa* L. e *Bixa orellana* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* planctônicas e sésseis em polipropileno**. 2010. 128 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- CARDOSO, M. das G. et al. **Óleos essenciais**. Lavras: Universidade Federal de Lavras - Pró-Reitoria de Extensão, 2000. 42 p.
- CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v. 12, n. 1, p. 1-55, Mar. 2004.

DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G. Characterization of essential oils from Lamiaceae species by Fourier transform Raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 5503-5507, Aug. 2002.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.54, p. 2745-2749, Mar. 2006.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análise estatísticas e planejamento de experimentos Versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software

FURLAN, M.R. et al. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* DC) staf, Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, n. 5, p. 686-691, Out./Nov. 2010.

GIARDINO, L. et al. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotics. **Journal Endodontics**. Baltimore, v.32, n. 11, p. 1091-1093, Nov. 2006.

ISCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p.3943-3946, July 2002.

LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resinace – a challenge for the food industry. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 51, n. 4, p. 283-290, June 2003.

LAWRENCE, H.; ENZO, A.P. Activity of Essential oils against *Bacillus subtilis* Spores. **Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.19, n. 12, p. 1590-1595, Dec. 2009.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, Mar./Abr. 2005.

MAHADY, P. S. et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research**, London, v.19 n.11, p. 988–991, Nov. 2005.

MARONGIU, B; PIRAS, A; PORCEDDA, S. Comparative analysis of the oil and supercritical CO₂ extract of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 6278-6282, Oct. 2004.

MILANO, N. F.; KOLLING, I. G.; FACCHIN, E. F. Tensão superficial de alguns auxiliares químicos usados em endodontia. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 37-38, 1983.

MORAES, M. S. V. et al. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.3, p. 325-329, Sept/Dec. 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard**. 8ed. Wayne: NCCLS, 2003. (NCCLS document M2-A8).

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Oxford, v. 21, p. 540-553, 2010.

PÉCORÁ, J. D.; GUIMARÃES, L. F. SAVIOLI, R. N. Surface tension of several drugs used in endodontics. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.2, n. 1, p. 123-127, 1991.

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, May/June 2008.

PERIAGO, P. M. et al. Bacillus magaterium spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. **Food Technology and Biotechnology**, Chicago, v.44, p.17-23, 2006.

PIRHONEN, T. I. et al. Biochemical and toxic diversity of *Bacillus cereus* in a pasta and meat dish associated with a food-poisoning case. **Food Microbiology**, London, v. 22, p. 87-91, Jan. 2005.

RAVINDRAN, M. K. **Cardamom: The genus Elettaria**. New York: Taylor and Francis. 2002, 456p.

SACCHETTI, G. et al. Comparative Evaluation of 11 essential Oils of Different Origin. **Food Chemistry**, London, v. 91, p. 621-632, Aug.2005.

SANTIN, M. R. et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, p. 1489-1496, Aug. 2009.

SOUZA, E. L. et al. Antimicrobial effectiveness of spices: na approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, p. 549-558, July 2005.

TURINA, A. V. et al. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 122, p. 101-113, July 2006.

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

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic Hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *B. cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n. 4, p. 1561-1568, Apr. 2002

VALERO, M. et al. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, London v. 19 p. 491-499, Oct.2002.

VERBEL, J. O. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v 20, n. 4, p. 568-574, Aug./Sept. 2010.

**CAPÍTULO 3 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE BIOFILME DE
Bacillus cereus EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

RESUMO

Nesta pesquisa foi avaliada hidrofobicidade de cupons de prova de aço inoxidável AISI 304#4 sem e com filme condicionante e da cepa de *B. cereus* correlacionando com a capacidade de adesão e formação de biofilme de *B. cereus* utilizando um modelo de adesão, além de avaliar a eficiência de soluções sanitizantes à base de óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* e *Cymbopogon citratus*, individuais e em combinação, e solução controle, em dois tempos de contato, sobre o biofilme maduro. A adesão do *B. cereus* à superfície de aço inoxidável sem e com filme condicionante atingiu 5,47 e 5,59 Log UFC.cm⁻², no tempo de 240 e 24 horas, respectivamente. As soluções à base de óleos essenciais mostraram-se efetivas em ambas as condições de superfícies avaliadas e tempos de contato. Sendo o tempo de contato de 30 minutos mais efetivo que o tempo de contato de 15 minutos. Pela microscopia eletrônica de varredura foi possível observar algumas alterações na membrana citoplasmática. Assim, soluções sanitizantes à base de óleos essenciais podem ser potencial alternativa no uso como sanificantes no procedimento de higienização na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Elettaria cardamomum*. *Cymbopogon citratus*. Sanitizantes. *B. cereus*.

ABSTRACT

This research assessed the hydrophobicity of stainless steel coupons AISI 304#4 both with and without conditioning film, and that of the *B. cereus* strain, relating it to adhesion and biofilm formation capabilities through an adhesion model; and the sanitizing potential of *Elettaria cardamomum* and *Cymbopogon citratus* essential oil based sanitizing solutions, assembled through both combination and isolation of such oils, as well as that of a control solution, at two contact times, against mature biofilm. The adhesion of *B. cereus* to stainless steel surfaces with and without conditioning film reached 5,47 and 5,59 Log UFC. cm⁻², at times of 240 and 24 hours, respectively. The essential oil based sanitizing solutions proved themselves effective under all evaluated superficial conditions and contact times. Contact times of 30 minutes were observed to be more effective than those of 15 minutes. Through scanning electron microscopy, it was possible to observe some alteration to the cytoplasmic membranes. Therefore, essential oil based sanitizing solutions may be a potential alternative to traditional hygiene practices in the food industry.

Keywords: *Elettaria cardamomum*. *Cymbopogon citratus*. Sanitizers, *B. cereus*.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é frequentemente mencionado como microrganismo esporulado, que em condições adversas à célula, podem transformar-se em endósporos (ANDERSON BORGE et al., 2001; ENEROTH et al., 2001). É considerado potencial causador de doenças de origem alimentar podendo produzir várias toxinas, principalmente a emética e a diarreica (GRANUM, 2001).

A literatura aponta três aspectos importantes decorrentes da presença de *B. cereus* na indústria de alimentos, que o torna problema difícil de ser controlado: primeiro, parece ser muito difícil evitar completamente a contaminação, uma vez que esta bactéria (na forma de células vegetativas ou endósporos) é amplamente disseminada no ambiente natural, principalmente no solo; segundo, os esporos são hidrofóbicos, com capacidade de adesão a diversas superfícies, e finalmente, a temperatura de processamento da maioria dos alimentos normalmente é insuficiente para destruir os esporos que permanecem viáveis no produto final (CARDOSO; LEITÃO, 1999; GRANUM, 2001).

Uma superfície mal higienizada, somada à capacidade de adesão de microrganismo, pode se tornar fonte potencial de contaminação e levar à formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção, sendo importante evitá-los nos processos iniciais, antes que os microrganismos sintetizem substâncias exopoliméricas (EPS).

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies se transformem em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular (ANDRADE, 2008).

Biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície (CARPENTIER; CERF, 1993).

Um termo que pode definir melhor os microambientes, que não se enquadram na definição clássica de biofilme, mas que apresentam risco potencial de contaminação dos alimentos é "potencial de biotransferência" (HOOD; ZOTTOLA, 1997). Assim, baixa contagem de células vegetativas e endósporos aderidos em determinada superfície não constituem um biofilme verdadeiro, porém pode levar a biotransferência desse ambiente, ou seja, a simples presença de microrganismos aderidos em superfície que poderiam eventualmente levar à contaminação dos alimentos (PENG; TSAI; CHOU, 2001).

Estudos realizados constataam que diversas superfícies encontradas nas indústrias de alimentos, como aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno e o ferro forjado, são passíveis de apresentar a formação de biofilmes, além de superfícies de alimentos, como frutas, vegetais, carcaças de animais e peixes (ANDRADE, 2008). O aço inoxidável é um dos principais materiais usados pelas indústrias de alimentos, devido a sua estabilidade térmica durante o processamento, além de ser fácil de higienizar e ter alta resistência à corrosão (PENG; TSAI; CHOU, 2001). A microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das bactérias contra as forças exercidas pelo fluxo do fluido (BERNARDES, et al., 2010). Em meio como a área alimentar, o aço inoxidável é modificado pela adsorção de camadas orgânicas, camada usualmente, referida como filme condicionante. Este filme modifica as propriedades físico-químicas da superfície do material (MACHADO, 2005), tornando-a mais propícia à adesão e formação de biofilme.

Considerando que a superfície de adesão é essencial para o desenvolvimento do biofilme, o entendimento, de como as propriedades do

substrato influencia o processo de adesão bacteriana pode ajudar a desenvolver alterações nas superfícies de forma que a adesão seja controlada.

A natureza da estrutura e a formação do biofilme resulta em significativa resistência à limpeza e sanitização. Métodos convencionais de controle e remoção de biofilme são geralmente ineficientes contra formação de biofilme bacteriano em ambientes industriais (KORENBLUM et al., 2008). Além disso, a resistência a antimicrobiano e práticas inadequadas de sanitização contribuem significativamente no processo de eliminação de biofilme. Entretanto, a resistência dos microrganismos a antimicrobianos tradicionais mostra a necessidade de pesquisas de novas estratégias de controle de biofilme (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

O uso de antimicrobianos naturais é considerado, atualmente, eficiente alternativa no controle de biofilme. Óleos de plantas são usados por diversos povos com diferentes propósitos ao longo de vários séculos (JONES, 1996). Vários estudos têm mostrado o potencial antimicrobiano de óleos essenciais, como o óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, no entanto pouca atenção tem sido dada ao óleo essencial de *Elettaria cardamomum*.

Assim, este trabalho se propôs a avaliar a hidrofobicidade de cupons de prova de aço inoxidável AISI 304#4 sem e com filme condicionante e da cepa de *B. cereus* correlacionando com a capacidade de adesão e formação de biofilme de *B. cereus*, buscando determinar a influência do fator tempo na adesão. Avaliar o potencial de biotransferência ao longo do processo de adesão e a ação sanificante dos óleos essenciais de *C. citratus* e *E. cardamomum*, puros e em combinação, em dois tempos de contato, sobre biofilmes maduro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Locais de execução do experimento

A determinação qualitativa dos constituintes químicos dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ), a avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos (DCA), as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), todos localizados na UFLA. A tensão superficial dos óleos e a hidrofobicidade das superfícies foram determinadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Indústria do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil.

2.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Bacillus cereus* ATCC 14579, adquirido da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, em Campinas, SP, Brasil.

2.2.1 Padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa

A padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa foram realizadas como descrito no capítulo 2 item 2.3.1.

2.3 Superfície

Para os ensaios envolvendo a formação de biofilmes foram utilizados cupons de aço inoxidável, tipo 304 (#4), (de dimensões 1 x 8 x 18 mm). Este material foi escolhido, por ser amplamente utilizado na fabricação de equipamentos. O modelo experimental da formação de biofilme de *Bacillus cereus* foi elaborado seguindo a metodologia de Oliveira et al (2010) , sendo a montagem: suporte de aço inoxidável AISI 304, # 4, composto por 4 estantes, cada qual com fendas para apoio de 21 cupons de aço inoxidável AISI 304, # 4, dispostos verticalmente (Figura 1); béquer de 1000mL; barra magnética e agitador magnético, utilizando com a finalidade de permitir a formação de fluxo do substrato por entre os cupons. O béquer foi lacrado com auxílio de papel alumínio.

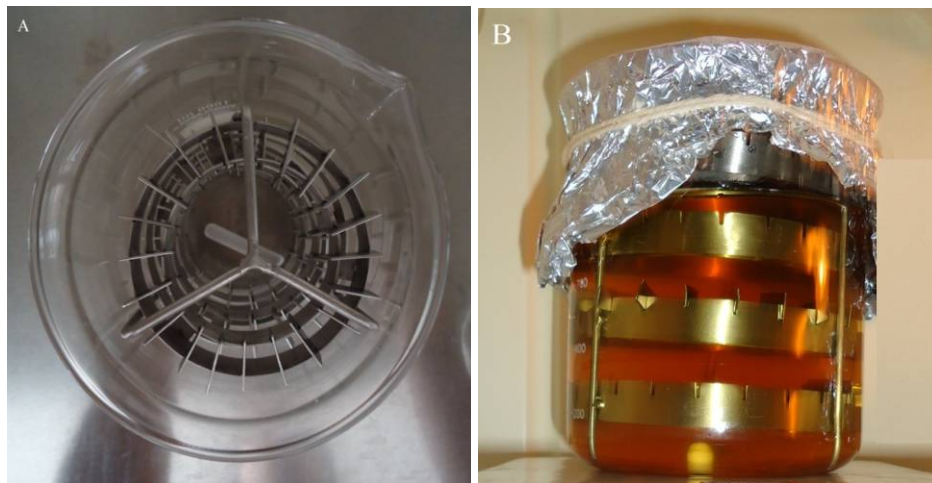


Figura 1 Modelo experimental de formação do biofilme (A) utilizando como substrato de crescimento bacteriano meio de cultura BHI (B)

2.3.1 Procedimento de higienização dos cupons e do suporte de aço inoxidável

Tanto os cupons de aço inoxidável quanto o suporte de aço inoxidável foram limpos por meio de abrasão mecânica com esponja de poliuretano com detergente líquido, enxaguados com água destilada e imersos em acetona 100% por 1 hora para remoção de gordura, foram enxaguados novamente com água destilada a 80 °C, secos por 2 horas a 60 °C e esterilizados em autoclave 121 °C/ 15 minutos (PARIZZI et al., 2004).

2.3.2 Condicionamento da superfície dos cupons

Com o objetivo de obter uma superfície de aço inoxidável coberta por filme condicionante semelhante ao encontrado em ambiente industrial, os cupons foram imersos durante uma hora em leite UHT à temperatura ambiente em Capela de Segurança Biológica. Logo em seguida, foram secos em estufa a 32 °C por 24 horas, e foram acondicionados em placas de Petri estéreis forradas com papel filtro, conforme a Figura 2.

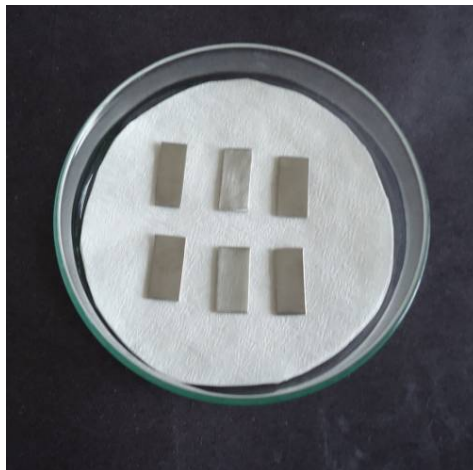


Figura 2 Cupons de aço inoxidável utilizado no experimento

2.3.3 Medidas de ângulo de contato

Foram determinados os ângulos de contato com água para as duas condições de superfícies avaliadas e para superfície da célula (Tabela 1). Após a higienização, os cupons de aço inoxidável foram transferidos com o auxílio de uma pinça, para o equipamento de medidas Goniômetro (kruss®, Alemanha). Foi feita a medição do ângulo de contato de uma gota de 2 μ L durante trinta segundos consecutivos. Foram feitas três repetições.

Tabela1 Superfícies avaliadas quanto ao ângulo de contato

1.	Aço Inoxidável AISI 304, # 4 sem filme condicionante
2.	Aço Inoxidável AISI 304, # 4 com filme de condicionante
3.	Superfície de células vegetativas de <i>B. cereus</i>

As medidas do ângulo de contato da superfície das células de *B. cereus* foram realizadas sobre uma camada de células vegetativas usando o método descrito por BUSSCHER et al. (1984). Inicialmente, *B. cereus* foi ativado duas vezes em caldo BHI com a finalidade de se obter uma suspensão da cultura ativa com aproximadamente 10^7 UFC/mL. Posteriormente, 30 mL da suspensão microbiana foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos, sendo em seguida lavados por três vezes, em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M. A massa celular foi ressuspensa em este mesmo tampão sendo depositada sobre filtro de membrana de acetato de celulose de 0,45 μ m de poro e 47 mm de diâmetro, por filtração a vácuo. Foram adicionados 30 mL de água ultrapura (Milli-Q) no momento da filtração. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para Placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v). As membranas foram cortadas em três partes sendo cada parte usada para medição do ângulo de contato.

2.4 Adesão das células vegetativas de *Bacillus cereus* a cupons de aço inoxidável

Em béquer de vidro de 1000 mL contendo uma barra magnética, foi adicionado 800 mL de BHI previamente esterilizado e 40 mL de BHI contendo a cultura bacteriana, obtendo a concentração final de aproximadamente 7,31 Log UFC.mL⁻¹. Em seguida os cupons de aço inoxidável sem ou com filme condicionante foram acoplados no suporte de aço inoxidável e disposto no interior do béquer, o qual foi lacrado e incubado, a 32 °C, sob agitação de 70 rpm. A cada 48 horas, os cupons foram retirados do suporte, com auxílio de pinça, e imersos em 10mL de solução salina por 1 minuto, para remoção das células planctônicas. Após esse procedimento, os cupons foram colocados em novo suporte limpo e esterilizados e imersos em 800 mL de BHI em um béquer estéril contendo uma barra magnética.

2.5 Determinação do número de células aderidas

O número de células vegetativas aderidas aos cupons de aço inoxidável foi determinado após 12, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo para superfície sem filme condicionante e após 2, 6, 12 e 24 para superfície com filme condicionante. Os cupons foram retirados do meio de cultivo, com auxílio de uma pinça estéril e imersos em 10mL de solução salina por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram imersos em tubos contendo volume apropriado de água peptonada a 0,1% (p/v) e submetidos ao vórtex, durante 2 minutos para remoção das células sésseis (PARIZZI et al., 2004). Diluições seriadas foram realizadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando a técnica de espalhamento em superfície. As placas de Petri foram incubadas a 32 °C por, aproximadamente 24 horas, e foi realizada a

contagem padrão em placas, expressa em Log UFC.cm⁻²). Todo experimento foi realizado em três repetições e as análises em duplicata.

2.6 Procedimento de higienização dos cupons com biofilmes

Para elaboração das soluções sanitizantes à base de óleos essenciais bem como a solução sanificante controle (sem adição de óleos essenciais), foram utilizados as seguintes proporções de óleos essenciais e diluentes (Quadro1). O Tween 80 foi adicionado com intuito de auxiliar na diluição dos óleos essenciais. Os óleos essenciais foram adicionados a solução salina (NaCl) 0,85% com 0,5%(v/v) de Tween 80 e agitado no vortex para homogeneização do mesmo. As concentrações de óleos essenciais e os tempos de contato foram baseados em estudos prévios do efeito bacteriostático e do tempo de ação bactericida, respectivamente, sobre células planctônicas de *B. cereus* (Capítulo 2).

Quadro 1 Composição das soluções à base de óleos essenciais e solução controle utilizadas na determinação do tempo bactericida, (A) *E. cardamomum*, (B) *C. citratus*, (C) combinação e (D) Controle

Solução	Solução Salina 0,85% (0,5% Tween 80) (µL/mL)	<i>E. cardamomum</i> (µL/mL)	<i>C. citratus</i> (µL/mL)	Total (µL)
A	984	16	0	1000
B	992	0	8	1000
C	996	2	2	1000
D	1000	0	0	1000

Os tempos de contatos utilizados foram de 15 e 30 minutos a temperatura ambiente. O tempo de 15 minutos foi baseado no maior tempo necessário para a eliminação das células planctônicas de *B. cereus*. O limite de 30 minutos foi escolhido levando-se em consideração o tempo de sanitização na indústria de alimentos.

No tempo de 24 e 240 horas, os cupons de prova foram mergulhados por 1 minuto em 10 mL de solução salina, removendo-se assim, as células planctônicas e, em seguida, imersos em 5 mL de solução sanificante à base de óleos essenciais e solução controle, durante os tempos de contatos determinados.

2.7 Determinação do número de células aderidas após a sanitização da superfície

O número de células aderidas aos cupons de aço inoxidável foi determinado após cada tratamento com as soluções sanitizantes à base de óleos essenciais e a solução controle. Visando verificar se a solução controle não influencia no número de células aderidas, também foram analisados os cupons sem nenhum tratamento sanificante. Os cupons foram retirados do meio de cultivo, com auxílio de uma pinça estéril e imersos em 10mL de solução salina por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas. Em seguida foram imersos em tubos contendo volume apropriado de água peptonada a 0,1% (p/v) e submetidos ao vórtex, durante 2 minutos para remoção das células sésseis (Parizzi, 2004). Diluições seriadas foram realizadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando a técnica de espalhamento em superfície. As placas de Petri foram incubadas a 32 °C por, aproximadamente 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em Log UFC.cm⁻². Todo experimento foi realizado em três repetições e as análises em duplicata.

2.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os cupons de provas submetidos aos tratamentos com solução sanificante à base de óleos essenciais e solução sanificante controle nos dois tempos de contato foram avaliadas por MEV. Para tal, os cupons foram imersos

em solução fixadora (Karnovsky modificado: 2,5% glutaraldeído, 2,5% formaldeído, em 0,05 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2 e 0,001 M CaCl₂) por no mínimo 24 horas. Em seguida, os cupons foram lavados com tampão cacodilato de sódio por três vezes de 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%, por 1 hora. Após este período foram lavados por três vezes em água destilada e desidratados em gradiente crescente de etanol (25%, 50%, 70% e 90% por 10 minutos; 99,9 por duas vezes de 10 minutos). Posteriormente, foram levados ao aparelho de ponto crítico (Bal-Tec CPD 030) para completar a secagem, montado em *stubs* e cobertos por ouro em metalizador (Bal-Tec SDC 050) (BOSSOLA; RUSSEL, 1998). Ao final desse procedimento foram obtidas eletromicrografias dos microrganismos aderidos à superfície de aço inoxidável, pelo microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo).

2.9 Delineamento experimental e análise estatística

Para análise estatística no experimento foi adotado um esquema fatorial 4 x 2 (sanificantes x tempos de contato), com o delineamento em blocos casualizados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Sisvar versão 5.1 (Ferreira, 2003) em que empregou-se a análise de variância por meio do teste F, para verificar a diferença entre os tratamentos. Quando significativos, a comparação de médias para os sanitizantes e o tempo foram realizados por meio do teste Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises dos ângulos de contato

Na tabela 2 são representados os valores médios dos ângulos de contato com as superfícies de células de *B. cereus*, cupons de prova com filme condicionante e cupons de prova sem filme condicionante.

O ângulo de contato com a água é o parâmetro que permite avaliar a hidrofobicidade de diferentes superfícies. Assim, para ângulos de contato superiores a 50° a superfície é considerada hidrofóbica e ângulos inferiores a 50° a superfície é hidrofílica (FAILLE et al., 2001). Assim a estirpe de *B. cereus* utilizada neste estudo pode ser considerada hidrofílica já que forma ângulo de contato com a água (Tabela 2). Utilizando o mesmo critério para os cupons de prova, as superfícies de aço inoxidável sem o filme condicionante foram consideradas hidrofóbicas, no entanto ao adicionar o filme condicionante à superfície de aço inoxidável ela se torna hidrofílica.

O caráter hidrofílico da superfície de aço na presença do filme condicionante de leite pode ser explicado pela interação dos diferentes componentes de superfície tais como proteínas (α_{S1} -caseína, β -caseína e β -lactoglobulina), minerais, fosfolípidios, gorduras e ácidos graxos livres (DICKINSON, 2001), com a superfície do aço inoxidável.

Em estudos realizados por Araújo et al. (2009) foram encontrado valores de hidrofobicidade semelhante aos encontrados nesse estudo para cepa de *B. cereus* ATCC 14579. Em tal estudo foi avaliada a hidrofobicidade de quatro cepas de *B. cereus*. Dessas, 3 apresentaram valores de ângulo de contato de $24,52^{\circ}$; $25,41^{\circ}$; $27,98^{\circ}$ e uma cepa foi hidrofóbica com valor de ângulo de contato de $78,73^{\circ}$.

Tabela 2 Valores médios dos ângulos de contato com as superfícies de células de *Bacillus cereus*, aço inoxidável com e sem filme condicionante

Superfície de Adesão	Ângulo de Contato*
Aço Inoxidável sem filme condicionante	64,58±5,4
Aço Inoxidável com filme condicionante	23,07±8,8
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	23,98 ±2,6

*média de três repetições

3.2 Adesão de *Bacillus cereus* ao aço inoxidável

Os dados relativos ao número de células vegetativas de *B.cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável sem e com filme condicionante após diferentes tempos de adesão são representados nas Figuras 3 e 5, respectivamente.

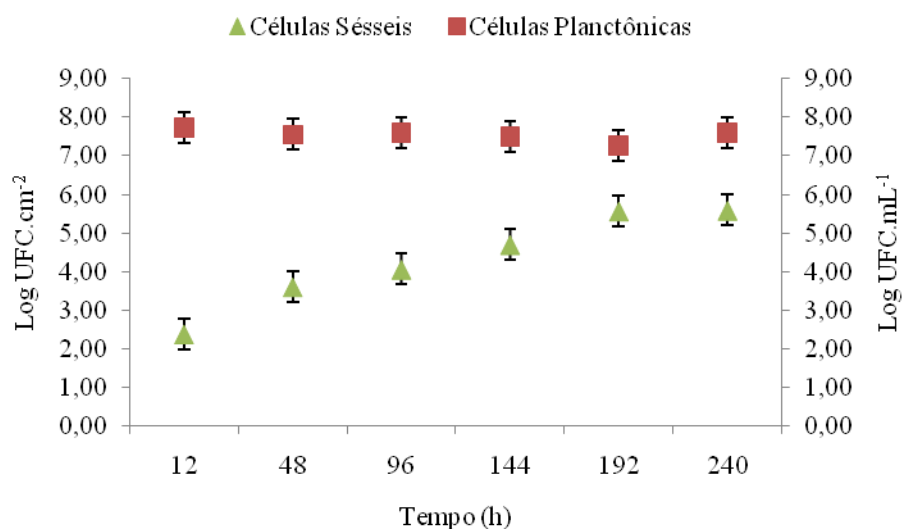


Figura 3 Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de células planctônicas e sésseis de *Bacillus cereus* em cupons de aço inoxidável sem filme condicionante após 12 horas à 240 horas de adesão

Na superfície sem o filme condicionante a cepa de *B. cereus* apresentou uma adesão relativamente boa nas primeiras 48 horas de cultivo, aproximadamente 3,61 ciclos Log, sendo que o crescimento máximo ocorreu após 240 horas de adesão (5,59 Log UFC. cm⁻²). Resultados semelhantes foram encontrados por Bernardes et al., (2010), onde a adesão foi avaliada ao longo de 10 dias atingindo no 4,43 Log UFC . cm⁻².

A diferenciação entre o que seja biofilme e adesão tem sido proposta em função do número de células aderidas por cm². Ronner; Wong (1993) consideram como biofilme um número de 10³ células aderidas por centímetro quadrado. Assim, segundo esses autores, na superfície de aço inoxidável sem filme condicionante, formou-se biofilme após o tempo de contato de 48 horas. Wirtanen; Husmark; Mattila-Sandholm (1996) e Andrade et al. (1998) afirmaram ser necessária uma população de células de 10⁵ e 10⁷ células por cm², respectivamente. Então de acordo com Wirtanen; Husmark; Mattila-Sandholm (1996) na superfície de aço inoxidável foi formado biofilme das células vegetativas após 192 horas de contato. Entretanto, para diferenciação entre adesão e biofilme devem ser consideradas as espécies envolvidas, pois sabe-se que espécies distintas irão apresentar diferentes comportamentos de adesão e formação de biofilme.

A adesão foi avaliada por eletromicrografia obtidas por microscópio eletrônico de varredura (MEV) da superfície submetida ao procedimento de adesão bacteriana (Figura 4).

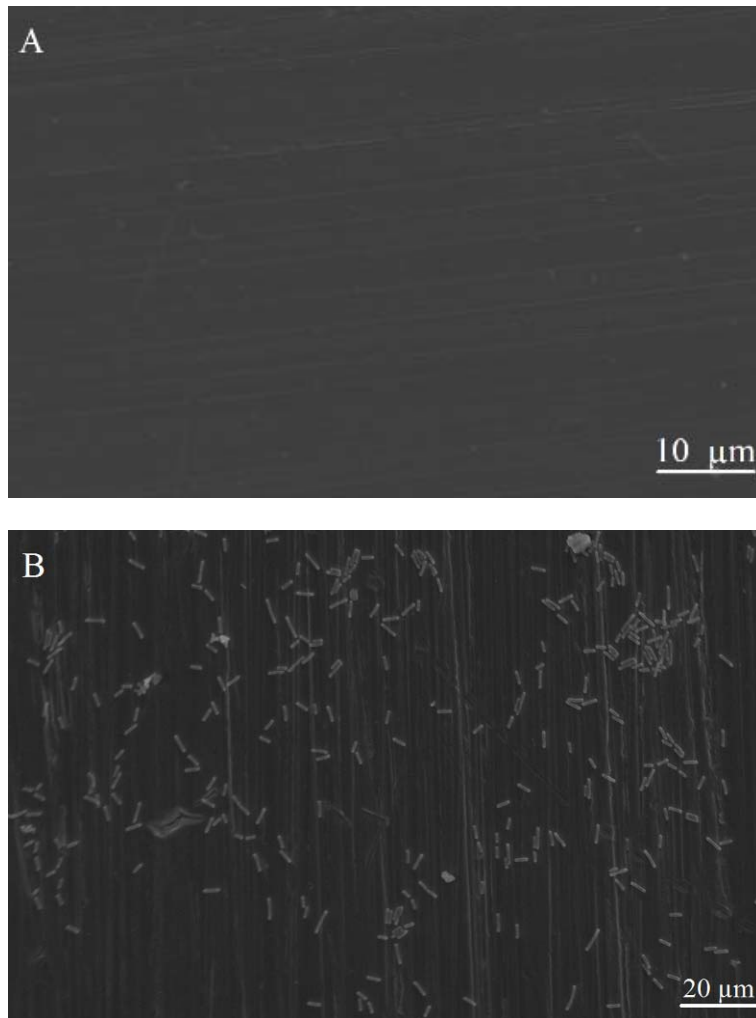


Figura 4 Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura mostrando a adesão de *B. cereus* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (± 4), após 240 horas de contato. (A) superfície sem filme condicionante e (B) Adesão de células vegetativas

Na superfície com filme condicionante a cepa de *B. cereus* aderiu-se a superfície de aço inoxidável mais rapidamente que na superfície sem filme condicionante.

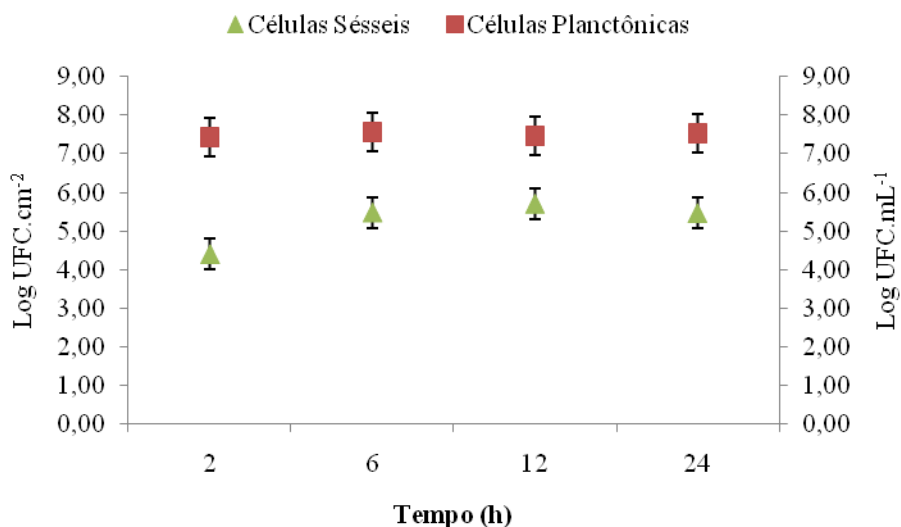


Figura 5 Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de células planctônica de *Bacillus cereus* aderido em cupons de aço inoxidável com filme condicionante após 2 horas à 24 horas de adesão

As células vegetativas, nas primeiras 2 horas atingiram aproximadamente 4,41 ciclos Log, sendo que o crescimento máximo ocorreu em 12 horas de adesão (5,71 Log UFC. cm⁻²), já em 24 horas a adesão foi de 5,47 Log UFC. cm⁻². Peng, Tsai e Chou (2001) analisaram o processo de adesão de células vegetativas de *B. cereus* em cupons de aço inoxidável AISI tipo 304, ± 4 com filme condicionante de leite. Obtendo uma adesão entre 3 Log UFC.cm⁻² a 6 Log UFC.Cm⁻².

Por MEV (Figura 6) foi possível observar a formação de biofilme de células vegetativas de *B. cereus* na superfície do aço inoxidável com filme condicionante.

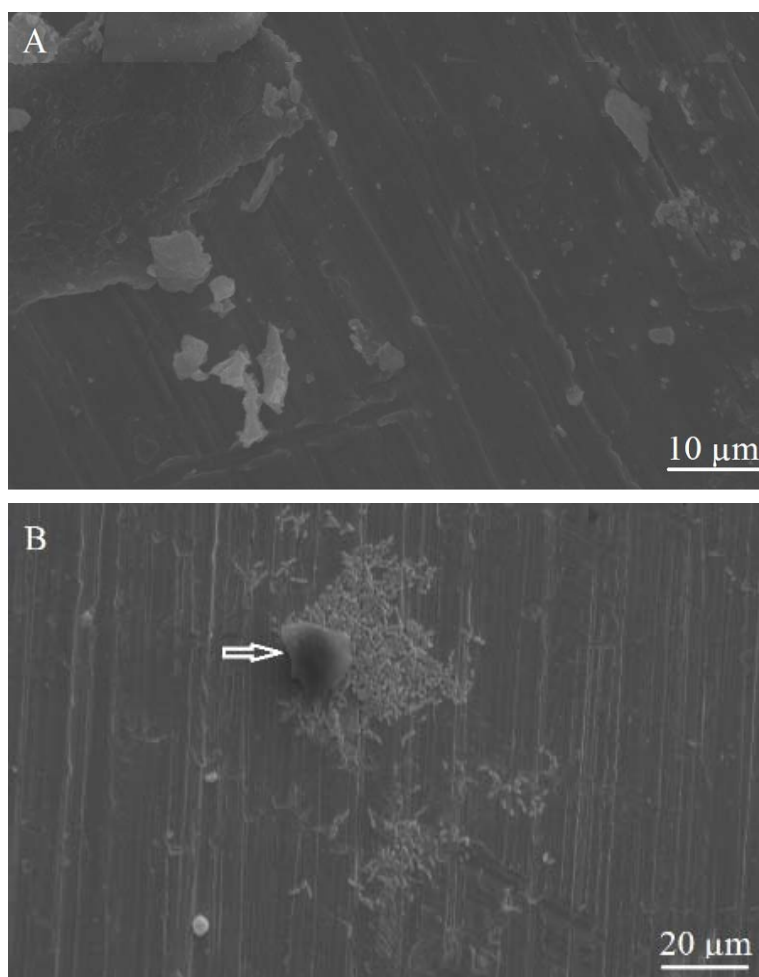


Figura 6 Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura mostrando a adesão de *B. cereus* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (± 4), após 240 horas de contato. (A) superfície com filme condicionante e (B) Adesão de células vegetativas

A comparação entre a adesão na condição de superfície sem filme condicionante e na condição de superfície com filme condicionante mostra a importância dos procedimentos de higienização nas superfícies que entram em contato com alimentos, pois se constatou que a formação de biofilme na superfície com filme condicionante pode ocorrer em curto período, o que mostra

a necessidade de se realizar boa higienização nas superfícies de equipamentos e utensílios.

O papel dos filmes condicionantes ainda não foi muito bem estabelecido no estudo da formação dos biofilmes. Alguns autores consideram que a formação do filme condicionante com leite é favorável a adesão (HOOD; ZOTTOLA, 1995), outros consideram desfavorável (BOWER; MCGUIRE; DAESCHEL, 1996; WONG, 1998), mas uma coisa é consenso entre todos, equipamentos mal higienizados, que permanecem com resíduos de alimentos em sua superfície, servem como fonte de nutrientes para os microrganismos ali aderir.

No processo de adesão entre duas superfícies, em meio aquoso, é preciso que o filme de água que as separa seja removido, e a hidrofobicidade contribui para essa remoção, favorecendo a adesão.

A hidrofobicidade celular é considerada por muitos pesquisadores um fator importante para adesão bacteriana. Características das superfícies, incluindo carga da superfície e da célula bacteriana e a hidrofobicidade tem sido relatados por afetar o processo de adesão a vários substratos, desde biomateriais a diferentes superfícies sólidas (AHIMOU et al., 2001).

Os cupons de provas de aço inoxidável sem filme condicionante possuem superfície considerada hidrofóbica e os cupons de provas com filme condicionante, possui superfície considerada hidrofílica pelas medidas do ângulo de contato com a água. Já a superfície do *B. cereus* utilizada era hidrofílica. Segundo Araújo et al.,(2009), tais adesões (superfície hidrofóbica - hidrofílica e hidrofílica - hidrofílica) são termodinamicamente desfavoráveis.

Os resultados encontrados nesse estudo, no entanto, não são condizentes com a literatura, ao contradizer a hipótese de que a hidrofobicidade celular é importante na adesão no material testado. Apesar de termodinamicamente desfavorável a adesão ocorreu nas superfícies com e sem filme condicionante,

sendo o processo de adesão mais rápido na superfície com filme condicionante (superfície hidrofílica), o que contradiz o relatado por diversos autores. Segundo estes a adesão relacionada à hidrofobicidade e hidrofiliabilidade da superfície de suporte e à superfície de diversas bactérias, tem mostrado que é altamente facilitada quando interagem superfícies hidrofóbicas. Sendo menor, entre suportes hidrofóbicos e bactérias hidrofílicas e dificultadas quando ambas as superfícies são hidrofílicas (ASSANTA et al., 2002; LIU et al. 2004).

Pesquisas realizadas por Bernardes et al (2010) demonstraram que em alguns casos a adesão é termodinamicamente desfavorável. No entanto, outros fatores devem ser considerados durante o processo de adesão.

Assim este estudo demonstra que o processo de adesão é “multifatorial”, envolvendo várias propriedades físico-químicas e fatores microbiológicos. Para melhor entendimento, seria necessário investigar o papel das proteínas da parede celular, assim como o papel das fimbrias e flagelos. Além disso, outras estruturas como polissacarídeos, presença de pili e cápsula têm sido relacionadas a processo de adesão e formação de biofilme. Na (Figura 7) pode-se observar o EPS produzido por *B. cereus*.

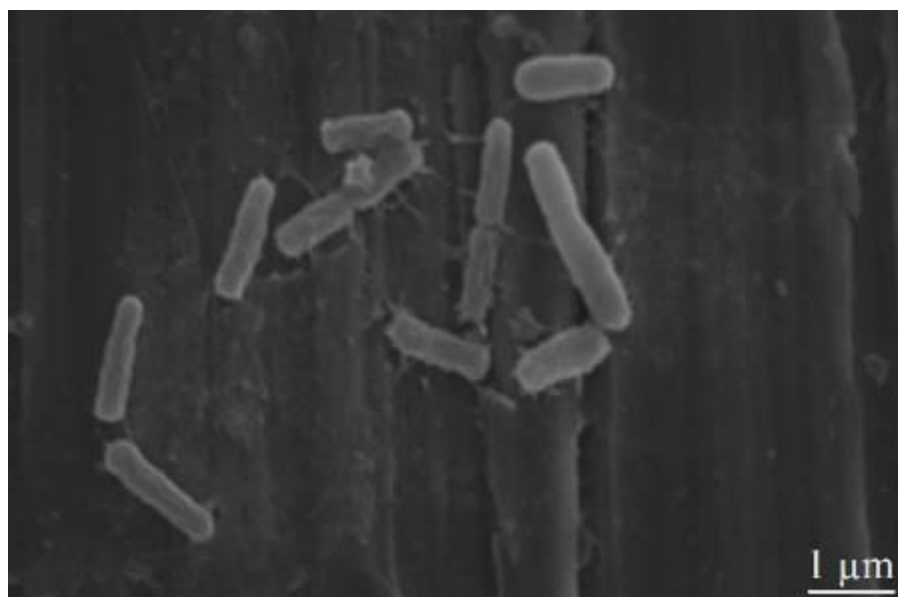


Figura 7 Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura mostrando produção de exopolissacarídeos por *Bacillus cereus* ATCC 14579 na superfície de aço inoxidável AISI 304 (± 4)

A adesão bacteriana à superfície ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível. A fase reversível se caracteriza pela fraca adesão da célula a superfície, propiciando fácil remoção das mesmas (MARSHALL; STOUT; MITCHEKK, 1971). Segundo Deibel, (2003) a adesão bacteriana irreversível ocorre na maioria dos casos entre 1 e 8 horas de adesão. Já Chmielewski e Frank (2003) relatam que esse tempo é inferior. Para eles a adesão irreversível pode ocorrer em alguns casos entre 20 minutos e no máximo 4 horas de contato e apresenta sérios riscos a indústria de alimentos, uma vez que as células aderidas são de difícil remoção.

Outra questão a ser considerada é a liberação de células viáveis para o alimento, a partir das células aderidas. Neste sentido, a preocupação maior deve ser com microrganismos que tenham curto tempo de geração mesmo aderido, pois nos produtos eles terão maior capacidade para crescer. Esses riscos são

agravados, uma vez que as células bacterianas podem permanecer aderidas após os procedimentos de higienização e se desprenderem do biofilme contaminando os produtos, num processo denominado biotransferência.

A contagem das células planctônicas na suspensão onde os cupons de aço inoxidável estavam imersos foi realizada paralelamente a contagem do número de células aderidas aos cupons. Vale ressaltar que o meio adicionado cada dois dias ao Becker contendo o modelo experimental de adesão de célula vegetativa, era estéril. Assim sendo a contagem obtida no meio corresponde às células que se desprendiam dos cupons de aço durante o processo de formação de biofilme, esse efeito é denominado potencial de biotransferência.

Assim, o potencial de biotransferência do microrganismo torna-se uma medida interessante. As contagens de células planctônicas encontradas (Figura 3 e 5) indicam que o desprendimento das células de *Bacillus cereus* foi praticamente constante nas etapas analisadas independente da superfície possuir ou não filme condicionante e da maturação total do biofilme. Confirmando os dados obtidos por Breyers; Ratner, (2004) que relatam que ocorre desprendimento das células durante a fase reversível do biofilme.

Apesar do meio possuir inicialmente condições adequadas tais como nutriente e temperatura ideal, para o crescimento do microrganismo, após 48 horas esses nutrientes possivelmente estavam se esgotando e o microrganismo entrando numa fase de morte ou formação de endósporos. Essa tendência foi demonstrada através dos valores encontrados em todas as etapas de formação do biofilme ($<8,5 \text{ Log UFC. mL}^{-1}$, valor esse obtido na curva de crescimento quando em 7 horas de crescimento o microrganismo atinge o máximo de Log UFC. mL^{-1}). Outro fator a ser analisado é a transferência das células da forma planctônica para forma séssil, reduzindo assim o número de células presentes no meio.

Cardoso (2000) observaram que em crescimento de *B. cereus* no leite a temperaturas de 20 °C a bacteria atingiu em dois dias 7,74 Log UFC. mL⁻¹ e em 6 dias 9,19 Log UFC. mL⁻¹. Dose infecciosa relatadas na literatura é de 10⁵ células ou esporos por grama de alimento (RAJKOWSKI; BENNETT, 2003). Assim a rápida formação e consolidação do biofilme de *B. cereus* e da adesão de esporos na superfície com filme condicionante demonstra a importância do processo de limpeza e sanitização ser feito de forma eficiente na indústria de alimentos. Indicando assim, o potencial de risco devido a formação rápida do biofilme e o seu potencial de biotransferência atingindo assim doses infectante em pouco tempo.

3.3 Sanitização do biofilme de *B. cereus* em superfície de aço inoxidável

A eficiência de um produto antimicrobiano é dependente de vários fatores, entre os quais, concentração e tempo de contato com as bactérias, sendo estes os que mais exigem estudos, de forma a encontrar-se a dose e o tempo de exposição adequados. A ação das soluções sanitizantes utilizadas pode ser observada pelas contagens das células sésseis de *B. cereus* nos cupons de prova após seu tratamento com as mesmas. De acordo com análise de variância, houve diferença significativa (P<0,05) entre os tempos de contato analisados e entre as soluções sanitizantes, para ambas as superfícies avaliadas (superfície sem filme condicionante e superfície com filme condicionante) (Anexo B e C).

A Figura 8 representa a eficiência da sanitização das superfícies com diferentes óleos essenciais e sua combinação com e sem camada condicionante.

Observou-se que a solução sanitizante à base da combinação dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* foi a mais efetiva para ambas as superfícies. Isso permite hipotetizar o uso dos óleos essenciais em combinação sendo uma estratégia a ser considerada. O segundo melhor resultado foi solução

sanitizante constituída por óleo essencial de *C. citratus* para superfície sem filme condicionante. Já na superfície com filme condicionante não houve diferença significativa entre a solução à base de óleo essencial de *E. cardamomum* e *C. citratus* ($P < 0,05$). Todas as soluções sanitizantes diferiram significativamente da solução sanitizante controle ($P < 0,05$) (Figura 8).

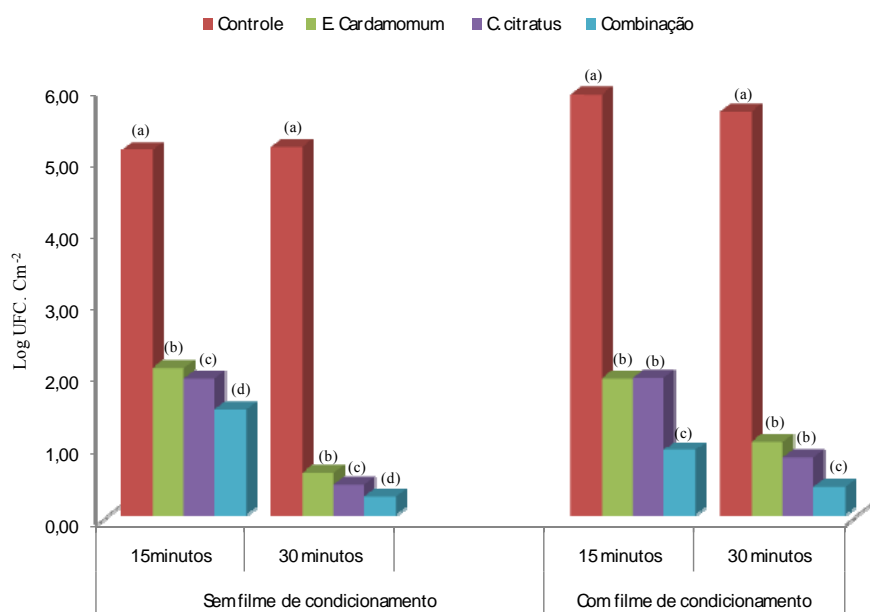


Figura 8 População de células sésseis de *B. cereus*, (em superfície sem filme condicionante e superfície com filme condicionante) após exposição a soluções sanitizantes à base de óleos essenciais

Os óleos essenciais de *E. Cardamomum* e *C. citratus* e sua combinação foram capazes de reduzir aproximadamente 3,05; 3,19 e 3,63 ciclos Log respectivamente, o número de células sésseis da superfície sem o filme condicionante após 15 minutos de contato e 3,97; 3,96 e 4,97 ciclos Log, respectivamente após 30 minutos de contato. Já na superfície com o filme condicionante houve a redução de 4,56; 4,72 e 4,88 ciclos Log após tratamentos

dos cupons de prova com óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* e sua combinação, respectivamente após 15 minutos e 4,60; 4,80 e 5,23 ciclos Log, respectivamente após 30 minutos.

Observa-se ainda que a redução do número de células aderidas à superfície apresentada pelo sanitizante compostos pela combinação dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* enfatiza a ação sinérgica dos óleos essenciais estudados. Oliveira et al. (2010) também relataram a ação sinérgica de óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* sobre *L. monocytogenes* aderidas em aço inoxidável. A maioria dos estudos encontrados na literatura relacionados ao sinergismo pela combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas é realizado *in vitro*, apresentando resultados promissores (DELAQUIS et al., 2002; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE., 2008), porém não correspondendo a realidade da presença de microrganismos em ambientes industriais.

Segundo Bakkli et al (2008) devido à grande variedade de constituintes químicos dos óleos essenciais, não existe um alvo específico na célula. O efeito tóxico apresentado pelos óleos essenciais sobre os microrganismos pode ser devido à alta complexidade de sua fórmula química, havendo evidências que sua atividade antimicrobiana seja atribuída aos efeitos aditivos de seus componentes majoritários e seus componentes traços (DORMAN; DEANS, 2000). Os grupamentos alcoois, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos podem explicar sua ação bacteriostática e/ou bactericida.

Os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* apresentaram terpenoides como seus principais constituintes químicos. No óleo essencial de *E. cardamomum* os componentes encontrados foram o 1,8-cineol, α -terpinil acetato, α -pineno, terpine-4-ol, sabineno, limoneno, α terpineol e mirceno. No óleo essencial de *C.citratus* os componentes foram o neral e o geranial que isomericamente formam o citral, o mirceno, o geraniol, o linalol, (E) β -ocimeno

e (Z) β -ocimeno além de outros componentes não identificados em ambos os óleos.

De acordo com Knobloch et al. (1986); citados por DORMAN; DEANS, 2000 os efeitos de terpenoides isolados em membranas bacterianas sugerem que sua atividade é uma função das propriedades lipofílicas dos terpenos constituintes, da potência dos seus grupos funcionais e sua solubilidade em água. Seu *site* de ação parece ser a bicamada fosfolipídica, causada por mecanismos bioquímicos catalisada pela bicamada de fosfolipídio da célula. Esses processos incluem a inibição de transporte de elétrons, a translocação de proteínas, etapas fosforilação e outras reações enzimáticas dependentes (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995). No entanto o mecanismo de ação dos monoterpenos não é completamente compreendido, sendo sua atividade na células como um todo, muito mais complexo (KNOBLOCH et al. 1989). Embora seu caráter lipofílico seja tendência observada, declarações específicas sobre a ação de terpenoides *in vivo* têm que ser avaliados individualmente, tendo em conta não só a estrutura dos terpenoides, mas também a composição química da parede celular (Knobloch et al., 1989). Estudos realizados por Dorman; Deans (2000) demonstram claramente as propriedades antibacterianas, embora os processos dos mecanismos não sejam bem entendidos.

Vários estudos têm demonstrado que os terpenoides são um dos principais contribuintes para ação antimicrobiana dos óleos essenciais, seguindo em maior potencial de atividade dentro do grupo dos terpenoides os que possuem alcoois, seguido pelos aldeidos e por último os que possuem grupos cetônicos (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1995).

Com relação ao tempo de contato utilizado, observou-se que o incremento do tempo de contato bactéria séssil - solução sanitizante à base de óleos essenciais, mostrou diferença significativa, com o aumento de tempo de contato ($P < 0,05$), para ambas superfícies avaliadas (superfície sem filme

condicionante e superfície com filme condicionante), indicando que a eficiência do sanitizante responde a incrementos do tempo de tratamento.

Na superfície sem filme condicionante, com o aumento do tempo de contato da solução sanitizante à base de óleos essenciais, ocorreu redução significativa no número de células. No tempo de 30 minutos ocorreu um aumento 71%, 78% e 82 % da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *E. cardamomum*, *C. citratus* e da combinação respectivamente, com relação ao tempo de 15 minutos. Já na superfície sem filme condicionante, com o aumento do tempo de contato da solução sanitizante à base de óleos essenciais, no tempo de 30 minutos ocorreu um aumento 59%, 46% e 57 % da sua atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *E. cardamomum*, *C. citratus* e da combinação respectivamente, com relação ao tempo de 15 minutos. A ação do óleo essencial se estende durante todo o tempo de contato com o microrganismo, melhorando assim a atividade antimicrobiana do mesmo.

Como a ação biocida dos óleos essenciais, pode promover aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática e posterior extravasamento do conteúdo celular. Apesar das bactérias suportarem pequenos danos na membrana e possuírem capacidade de reparação dos mesmos, o aumento do tempo de contato com solução sanitizante aumenta a extensão do dano inviabilizando o reparo da membrana celular. Assim, quanto maior o tempo de contato da solução sanitizante à base de óleo essencial, possivelmente maior será a capacidade do mesmo de se deslocar em direção a célula bacteriana, afetando assim seu funcionamento.

Nas eletromicrografias foi possível observar a ação antibacteriana dos óleos essenciais presentes nas soluções sanitizantes sobre *B. cereus*. As eletromicrografias de varreduras revelaram as alterações estruturais na superfície celular. As células de *B. cereus* apresentaram superfície disforme, com aparência superficial rugosa e em consequência desse fato, possível

comprometimento das atividades biológicas da célula. Tais alterações estruturais, provavelmente, causadas pela atuação dos óleos essenciais inicialmente na membrana celular, provocando alterações nos mecanismos de transportes, permeabilidade e com posterior extravasamento dos constituintes intracelulares. Foi evidenciado, para ambas as superfícies utilizadas (sem filme condicionante e com filme condicionante), o mesmo comportamento das células frente aos óleos essenciais presentes no sanitizante utilizado (Figura 9 e 10).

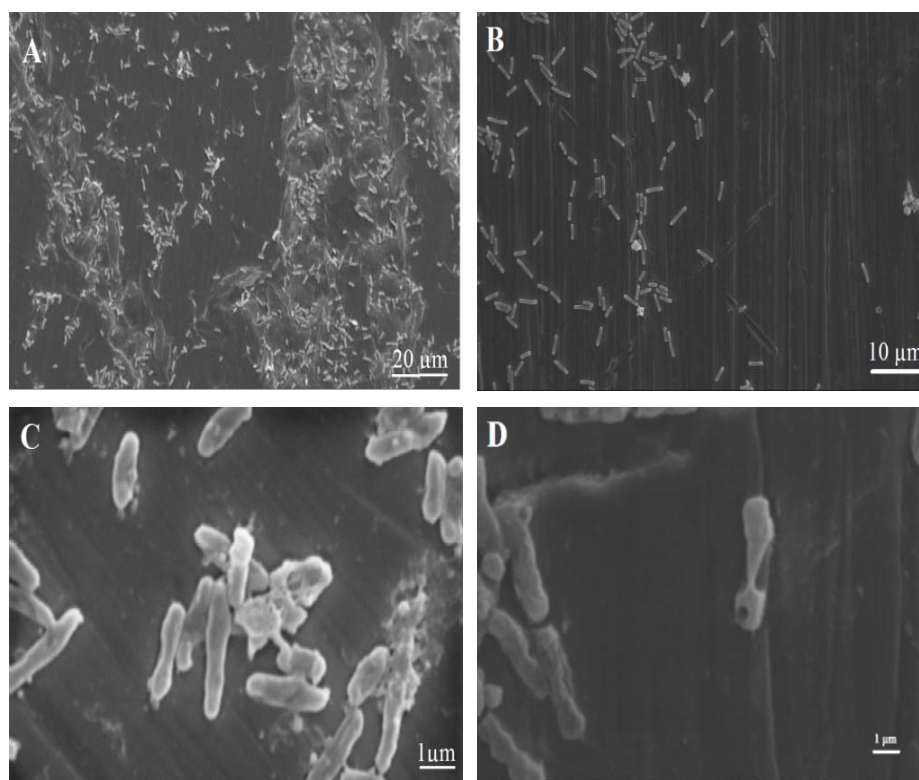


Figura 9 Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura de células de *B. cereus* aderidas em superfície de aço inoxidável sem filme condicionante (A) e tratadas com óleos essenciais de *C. citratus* (B), *E. cardamomum* (C) e combinação (D).

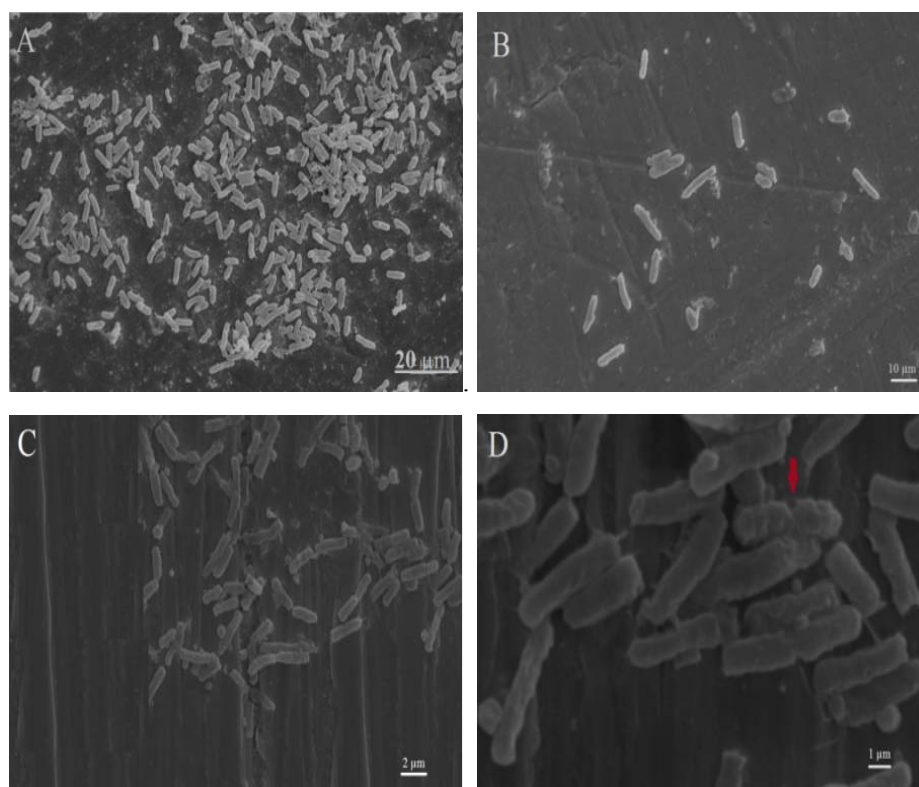


Figura 10 Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura de células de *Bacillus cereus* aderidas em superfície de aço inoxidável com filme condicionante (A) e tratadas com óleos essenciais de *C. citratus* (B), *E. cardamomum* (C) e combinação (D)

Sendo *B. cereus* uma bactéria Gram-positiva, entende-se que a parede celular deste não funciona como barreira para que esses compostos com atividade antibacteriana não tenham acesso à membrana. Assim a membrana externa tem sido reportada como proteção a ação de agentes sanificantes. No entanto, os terpenoides devido a suas característica lipofílicas e a capacidade de complexar cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} atuaram destruindo a estrutura da bicamada lipídica e quebrando a permeabilidade da membrana (GRIFFIN, 1979), permitindo que os óleos essenciais atuem como agentes antibacterianos.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que apesar da influência da hidrofobicidade da superfície no processo de adesão, como características fisiológicas do microrganismo, bem como outros fatores físico-químicos prevalecem durante a formação do biofilme.

As soluções sanitizantes à base de óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* apresentaram eficiência na remoção de células de *B. cereus* aderidas. O tempo de contato deve ser mais bem estudado para potencializar a ação do uso de sanitizantes à base de óleos essenciais. Soluções sanitizantes à base de óleos essenciais podem ser potencial alternativa no uso como sanificantes no procedimento de higienização na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

AHIMOU, F. et al. Influence of electrical properties on the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 45, n.2, p. 119-126, June 2001.

ANDERSON BORGE, G. I. et al. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, p. 237–246. Sept. 2001.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. 400 p.

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

ARAÚJO, E. A. et al. Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 20, p. 491-497, July/Sept. 2009.

ASSANTA, M. A. et al. Attachement of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames v.65, n. 8, p. 1240-1247, Aug. 2002.

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

BERNARDES, P. C. et al. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n.4, p. 984-992, Oct./Dec. 2010.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2 ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacterial and spores on food-contact surfaces. **Trend in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 152-157, May 1996.

BREYERS, J. D.; RATNER, J. P. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News-American Society for Microbiology**, Ann Arbor, v. 70, p. 232–237, May 2004.

BUSSCHER, H. J. et al. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 5, p. 980-983, Nov. 1984.

CARDOSO, A. L. M. P. **Ocorrência, Multiplicação e Produção de Toxina Diarréica por Cepas Mesófilas e Psicotróficas de *Bacillus cereus*, em Leite Pasteurizado**. Tese (Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.

CARDOSO, A. L.M.P. ; LEITÃO, M. F. . *Bacillus cereus* Mesófilo e Psicotrófico em Leite Comercial Pasteurizado. In: XVI Congresso Nacional de Laticínios, 1999, Juiz de Fora (Org.). **Revista do Instituto de Laticínios**. Juiz de Fora: Central Formulários Ltda, 1999. v. 54, p. 89-93.

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

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. 22-31, Jan. 2003.

DICKINSON, E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 20, n.3, p. 197–210, Mar. 2001.

DEIBEL, V. Develop a Defense Against Biofilms. In: DEIBEL, V.; SCHOENI, J. (Eds). **Food Safety Magazine**, Glandale: Target Group, Dec. 2002/Jan. 2003. p.1-6.

DELAQUIS, P. J. et al. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n.1/2, p. 101-109, Mar.2002.

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, Feb. 2000.

ENEROTH, A. et al. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. **Journal of Dairy Research**, Cambridge v.68, p.189-196, May 2001.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BEÂNEÂZECH, T. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 892-900, Feb. 2001.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análise estatísticas e planejamento de experimentos Versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.

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

GRIFFIN, S. Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. **Physics Bulletin**, London, v. 30, p. 262, Oct. 1979.

GUTIERREZ, J. BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008.

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

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Growth media and surface conditioning influence the adherence of *Pseudomonas fradi*, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 9, p. 1034-1037, 1997.

JONES, F.A. Herbs – useful plants. **Journal of The Royal Society of Medicine**, London, v. 89, p.717–719, Dec. 1996.

KNOBLOCH, K. et al. Antimicrobial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 1, n. 3, p. 119-128. May/June 1989.

KNOBLOCH, K. et al. **Progress in Essential Oil Research** (ed). Brunke E. J. Berlin:Walter de Gruyther. 1986. p.429.

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

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

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controle da formação de biofilmes indesejáveis.** Dissertação (Mestrado Engenharia Biológica) - Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Minho. 2005.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, London, v. 68, n. 3, p. 337-348, 1971.

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

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

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 105-11, Apr.2001.

RAJKOWSKI, K. T.; BENNETT, R. W. *Bacillus cereus*. In: MILIOTIS, M. D.; BIER, J. W. (Ed.) **International Handbook of Foodborne Pathogens**, New York: CRC, 2003. p. 27-39.

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

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

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

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**, Ames, v.59, n.7, p.727-733, July 1996.

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2765-2770, Oct. 1998.

**CAPÍTULO 4 *Bacillus cereus*: ADESÃO DE ENDÓSPOROS E
RESISTÊNCIA A SANITIZANTES À BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

RESUMO

Nesta pesquisa foi avaliada hidrofobicidade de cupons de prova de aço inoxidável AISI 304#4 sem e com filme condicionante correlacionando com a capacidade de adesão de endósporos de *B. cereus* utilizando modelo de adesão, além de avaliar a eficiência de soluções sanitizantes à base de óleos essenciais de *Elettaria cardamomum* e *Cymbopogon citratus*, individuais e em combinação, e solução controle, em dois tempos de contato, sobre os endósporos aderidos. A adesão de endósporos de *B. cereus* a superfícies de aço inoxidável sem e com filme de condicionante atingiu 3,70 e 3,29 Log UFC.cm⁻², no tempo de 240 e 24 horas, respectivamente. As soluções à base de óleos essenciais mostraram-se efetivas em ambas as condições de superfícies e tempos de contato avaliados, sendo o tempo de contato de 30 minutos mais efetivo que o de 15 minutos. Pela microscopia eletrônica de varredura foi possível observar alterações na estrutura do endósporo. Assim, o procedimento de sanitização utilizando soluções sanificantes à base de óleos essenciais reduziu significativamente o número de endósporos aderidos a superfícies de aço inoxidável, apesar da resistência dos mesmos a grande maioria dos sanitizantes tradicionais.

Palavras-chave: *Elettaria cardamomum*. *Cymbopogon citratus*. Sanitizantes. Endósporos.

ABSTRACT

This research assessed the hydrophobicity of stainless steel coupons AISI 304#4 both with and without conditioning film, and that of the *B. cereus* endospore, relating it to adhesion capabilities through an adhesion model; and the sanitizing potential of *Elettaria cardamomum* and *Cymbopogon citratus* essential oil based sanitizing solutions, assembled through both combination and isolation of such oils, as well as that of a control solution, at two contact times, against mature biofilm. The adhesion of endospore to stainless steel surfaces with and without conditioning film reached 3,70 and 3,29 Log UFC.cm⁻², at times of 240 and 24 hours, respectively. The essential oil based sanitizing solutions proved themselves effective under all evaluated superficial conditions and contact times. Contact times of 30 minutes were observed to be more effective than those of 15 minutes. Thus, the sanitation procedures using sanitizing solutions based on essential oils significantly reduced the number of endospores attached to stainless steel surfaces, despite the resistance of these the vast majority of traditional sanitizers.

Keywords: *Elettaria cardamomum*. *Cymbopogon citrates*. Sanitizers. Endospore.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma bactéria Gram - positiva encontrada na natureza em duas formas diferentes: célula vegetativa, isto é, metabolicamente ativa, sendo capaz de se reproduzir e na forma dormente denominada endósporo.

Endósporos bacterianos são tipos diferenciados de células com estruturas especiais para sobreviver em condições adversas (HENRIQUES; MORAN Jr., 2007). Em adição, endósporos de *B. cereus* possuem superfície altamente hidrofóbica, coberta por vários e longos apêndices, característica que lhe confere capacidade de aderir eficientemente em diferentes superfícies (HUSMARK; RONNER, 1992; KLAVENES, et al., 2002). Assim, é motivo de preocupação constante na indústria de alimentos. Uma vez que são altamente resistentes e dotados de capacidade de adesão, podem permanecer no alimento após seu processamento (FAILLE; FONTAINE; BENEZECH, 2001) e aderidos às superfícies industriais após o processo de limpeza e sanitização (PENG; TSAI; CHOU, 2002).

Cuidados com o controle e eliminação de *B. cereus* têm aumentado nos últimos anos, pois em condições favoráveis os endósporos germinam dando origem a células vegetativas capazes de produzir toxinas apresentando riscos a saúde pública, uma vez que *B. cereus* responsável por gastroenterites de origem alimentar. As toxinas podem ser proteínas instáveis ao calor, produzidas após a ingestão do alimento contaminado por células viáveis (toxina diarreica), ou por peptídeos estáveis ao calor, formado pelo microrganismo no alimento (toxina emética). Além disso, pode dar origem a deterioração de vários alimentos, como na indústria de laticínios, onde pode causar coagulação doce e desenvolvimento de diversos sabores estranhos em leite (FAILLE; FONTAINE; BENEZECH, 2001; PENG; TSAI; CHOU, 2002).

Para combater este crescente problema, grandes esforços concentram-se na realização de um processo de higienização adequado, ou seja, que siga corretamente as normas de limpeza e sanitização determinadas, como a determinação de soluções sanitizantes eficientes, tempo e temperatura de aplicação, fluxo da solução (ANDRADE, 2008). Além disso, para se obter limpeza eficaz é essencial o conhecimento sobre os mecanismos de adesão dos endósporos. Assim, pelo fato de endósporo bacteriano possuir maior capacidade de adesão que células vegetativas, devido à sua alta hidrofobicidade e morfologia é importante a escolha de santificantes eficientes, capazes de atuar sobre os endósporos. Atualmente, a maioria dos sanitizantes tradicionais utilizados, possuem ação bactericida e esporostático, mas raramente são esporicidas. Logo, novos métodos capazes de simultaneamente eliminar células vegetativas e endósporos bacterianos são desejados em uma variedade de indústria de alimentos. Recentemente a atenção tem sido voltada para produtos naturais, como óleos essenciais que tem ação bactericida e esporicida.

Várias pesquisas buscam a utilização de novos compostos antimicrobianos em alternativa aos tradicionais, devido principalmente pelo declínio do número de aprovações de novos fármacos e perda iminente de proteção de patentes e importantes fármacos. Além disso, observa-se um aumento do número de bactérias que se mostram resistentes aos agentes sanitizantes, tanto na área médica quanto na indústria de alimentos. Dessa forma, os óleos essenciais passaram a ter atenção dos pesquisadores visando à obtenção de compostos ou misturas deles a fim de utilizá-los com agentes antimicrobianos.

Óleos essenciais são compostos orgânicos de estrutura química heterogênea encontrados, em vários gêneros de plantas. São líquidos viscosos e podem ou não exalar odor (SARTARATTO et al., 2004). Trabalhos realizados em todo o mundo (BAYDAR et al, 2004; DELAMARE et al., 2007;

NICKAVAR; MOJAB; DOLAT-ABADI, 2005; VIUDA-MARTUS et al., 2007) e na Universidade Federal de Lavras (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; PEREIRA et al., 2008) mostram que vários óleos essenciais possuem atividade bactericida. Apesar do grande número de pesquisas com células vegetativas, ainda existe poucos estudos com endósporos bacterianos.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a hidrofobicidade de cupons de prova de aço inoxidável AISI 304#4 sem e com filme condicionante correlacionando com a capacidade de adesão de endósporos de *B. cereus* utilizando um modelo de adesão, além de avaliar a ação sanitizante de óleos essenciais sobre endósporos de *Bacillus cereus* aderidos em cupons de prova de um modelo de formação de biofilme e fornecer subsídios à indústria para controle deste microrganismo.

2 MATEIRAL E MÉTODOS

2.1 Locais de execução do experimento

O experimento foi realizado nos locais descritos no capítulo 3 item 2.1.

2.2 Microrganismo

O microrganismo neste trabalho foi *Bacillus cereus* ATCC 14579 conforme descrito no capítulo 3 item 2.2.

2.2.1 Padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa

A padronização, estocagem e preparo do inóculo da célula vegetativa foram realizadas como descrito no capítulo 2 item 2.3.1.

2.2.2 Padronização, estocagem e preparo do inóculo do Endósporo

A padronização, estocagem e preparo do inóculo do endósporo foram realizadas como descrito no capítulo 2 item 2.3.2.

2.3 Superfícies

As superfícies utilizadas foram às mesmas descritas no capítulo 3 item 2.3.

2.3.1 Procedimento de higienização dos cupons e do suporte de aço inoxidável

O procedimento de higienização dos cupons e do suporte foi realizado conforme descrito no capítulo 3 item 2.3.1.

2.3.2 Condicionamento da superfície dos cupons

O condicionamento da superfície dos cupons foi realizado conforme descrito no capítulo 3 item 2.3.2

2.3.3 Medidas de ângulo de contato

As medidas do ângulo de contato foram realizadas conforme descrito no capítulo 3 item 2.3.3.

2.4 Adesão de endósporos de *Bacillus cereus* a cupons de aço inoxidável sem e com filme condicionante

Em béquer de vidro de 1000 mL contendo uma barra magnética foi adicionado 800 mL de suspensão de endósporos com aproximadamente $5,36 \text{ Log endósporo.mL}^{-1}$. Em seguida os cupons de aço inoxidável sem ou com filme condicionante foram acoplados no suporte de aço inoxidável e dispostos no interior do béquer, o qual foi lacrado e incubado, a 32°C , sob agitação de 70 rpm.

2.5 Determinação do número de células aderidas

O número de endósporos aderidos aos cupons de aço inoxidável foi determinado após 12, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo para superfície sem filme condicionante e após 2, 6, 12 e 24 para superfície com filme condicionante. A princípio, os cupons foram retirados do meio de cultivo, com auxílio de uma pinça esterilizada e imersos em 10mL de solução salina por 1 minuto, para a remoção de endósporos não aderidos. Em seguida foram imersos em tubos contendo volume apropriado de água peptonada a 0,1% (p/v) e submetidos ao vórtex, durante 2 minutos para remoção das células sésseis (Parizzi, 2004). Diluições seriadas foram realizadas e o número de células viáveis determinadas em TSA, empregando a técnica de espalhamento em superfície. As placas de Petri foram incubadas a 32 °C por, aproximadamente 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas, expressa em Log UFC.cm⁻²). Todo experimento foi realizado em três repetições e as análises em duplicata.

2.7 Tensão superficial dos óleos essenciais

A tensão superficial dos óleos essenciais foi medida conforme descrito no capítulo 2 item 2.2.2.

2.8 Procedimento de higienização dos cupons aderidos com endósporos

O procedimento de higienização dos cupons aderidos com endósporos foi realizado como descrito no capítulo 3 item 2.7.

2.9 Determinação do número de endósporos após sanitização da superfície

O número de endósporos aderidos aos cupons de aço inoxidável foi determinado conforme descrito no capítulo 3 item 2.8.

2.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura foram realizadas conforme descrito no capítulo 3 item 2.8.

2.11 Delineamento experimental e análise estatística

Para análise estatística no experimento foi adotado um esquema fatorial 4 x 2 (sanificantes x tempos de contato), com o delineamento em blocos casualizados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Sisvar versão 5.1 (Ferreira, 2003) em que empregou-se a análise de variância por meio do teste F, para verificar a diferença entre os tratamentos. Quando significativos, a comparação de médias para os sanitizantes e tempos foram realizados por meio do teste Scott e Knott, a 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do ângulo de contato

Na Tabela 1 estão representados os valores médios dos ângulos de contato da água com os cupons de prova com e sem filme condicionante.

O ângulo de contato com a água é um critério de avaliação qualitativa de hidrofobicidade que permite avaliar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície com base no valor do ângulo de contato formado. Assim, para ângulos superiores a 50° a superfície é considerada hidrofóbica. Caso contrário, se o ângulo é inferior a 50° a superfície será hidrofílica (FAILLE; FONTAINE; BENEZECH, 2001).

Assim os cupons de prova de aço inoxidável sem o filme condicionante foram considerados hidrofóbicos, no entanto ao adicionar o filme condicionante à superfície de aço inoxidável ela se torna hidrofílica. A hidrofobicidade do aço inoxidável é controversa na literatura: alguns trabalhos o citam como sendo um material hidrofílico (MORETRO et al., 2003) outros, relatam que é hidrofóbico (PENG; TSAI; CHOU, 2001; BERNARDES et al., 2010). Contudo Boari (2009) explica que o aço AISI 304, o mais utilizado na indústria de alimentos, corresponde a uma liga de ferro e cromo e 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-se a combinar com este formando uma fina camada de óxido de cromo, com aproximados 40 Angstrom de espessura. Esta camada passiva é a responsável pela resistência à corrosão e pela hidrofobicidade do aço inoxidável. Como a maioria dos trabalhos foi feita com o mesmo material (aço inox AISI 304), chegando a resultados opostos com relação à hidrofobicidade, é possível

que haja diferenças em vários aspectos como em relação ao acabamento final ou manufatura do produto, ou mesmo em relação à tipificação do material.

O caráter hidrofílico da superfície de aço na presença do filme condicionante de leite pode ser explicado entre outros fatores, pela presença de cargas das proteínas presentes no mesmo.

Tabela 1 Valores médios dos ângulos de contato com as superfícies de células de *Bacillus cereus*, aço inoxidável com e sem filme condicionante

Superfície de Adesão	Ângulo de Contato*
Aço Inoxidável sem filme condicionante	64,58±5,4
Aço Inoxidável com filme condicionante	23,07±8,8

*média de três repetições

Segundo Araújo et al. (2009) a determinação da hidrofobicidade de superfícies é uma medida importante, pois entre duas superfícies hidrofóbicas, a adesão pode ser termodinamicamente favorável, visto que será mais fácil remover a água presente entre as duas superfícies para a adesão ocorrer.

A propriedade físico-química responsável pela capacidade de molhamento de superfícies é chamada tensão superficial. Neste trabalho foram encontrados baixos valores de tensão superficial para os óleos essenciais de *E. Cardamomum*, *C. Citratus* e combinação, 29,86; 32,33 e 30,22 mN/m, respectivamente. A tensão superficial é a força existente entre as moléculas de uma superfície e a substância que se encontra em contato com esta superfície, isto é, o efeito físico-químico que faz com que uma gota de líquido quando colocado sobre uma superfície, se espalhe ou fique concentrada em um local. Como os sólidos, no caso as superfícies de aço inoxidável, exercem força de atração sobre as moléculas dos líquidos, quando essa força é maior do que a tensão superficial dos líquidos, ocorre o molhamento da superfície. Portanto, quanto menor a tensão superficial de uma substância, maior será sua capacidade de penetração, aumento a efetividade da sanitização (GIARDINO et al., 2006).

3.2 Adesão de endósporos *Bacillus cereus* ao aço inoxidável

Os dados relativos ao número de endósporos de *B.cereus* aderidos aos cupons de aço inoxidável e endósporos livres no meio nas duas condições de superfícies avaliados após diferentes tempos de adesão estão representados na Figura 1 e 2. Observou-se que os endósporos de *B. cereus* apresentaram capacidade de adesão nos cupons de prova de ambas as condições de superfícies (superfícies sem e com filme condicionante), porém, não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre eles nos tempos de adesão avaliados.

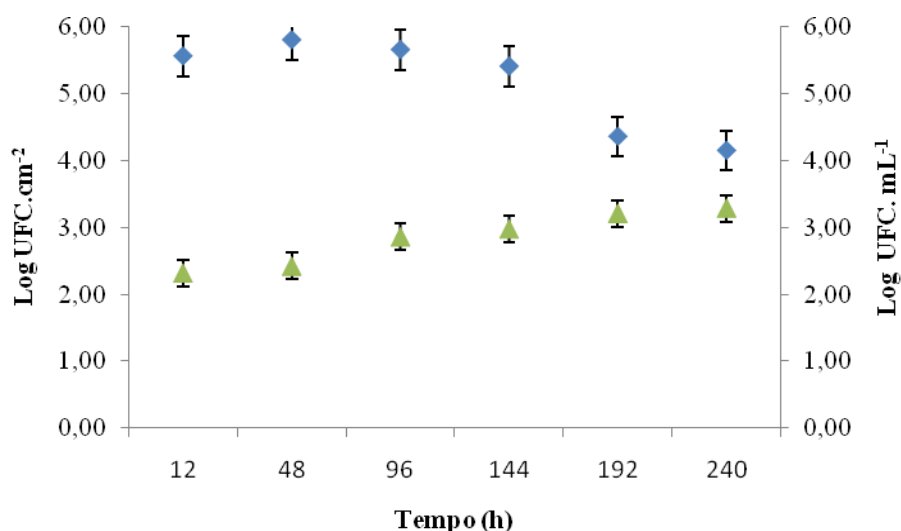


Figura 1 Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de endósporos de *Bacillus cereus* aderido em cupons de aço inoxidável sem filme de condicionante no tempo de 12 horas à 240 horas de adesão

O meio contendo endósporos não foi repostado ao longo de todo experimento. Sendo os endósporos metabolicamente inativos, não ocorre alteração da sua quantidade, nem seu crescimento ou morte durante o experimento. No entanto observou-se oscilações no número de endósporos livres

presentes no meio. Isso é devido à mudança dos endósporos da forma livre para forma séssil.

A adesão de endósporo atingiu 2,32 Log UFC. cm⁻² no período de 12 horas, mantendo-se sem grandes variações até o tempo de 144 horas. Atingindo o máximo de adesão em 240 horas, 3,29 Log UFC. cm⁻² (Figura 1). A boa capacidade de adesão (64%) no último tempo testado, aliada ao fato de que os endósporos são mais resistentes ao calor, pode resultar em problemas na indústria de alimentos, já que pode haver endósporos resultantes nas etapas de processamento térmico, e conseqüente adesão nos equipamentos. Com o passar do tempo, esses endósporos podem germinar e dar origem a um biofilme, que poderá servir como fonte constante de contaminação.

Na superfície com filme condicionante os endósporos de *B. cereus* aderiram à superfície de aço inoxidável mais rapidamente que na superfície sem filme condicionante.

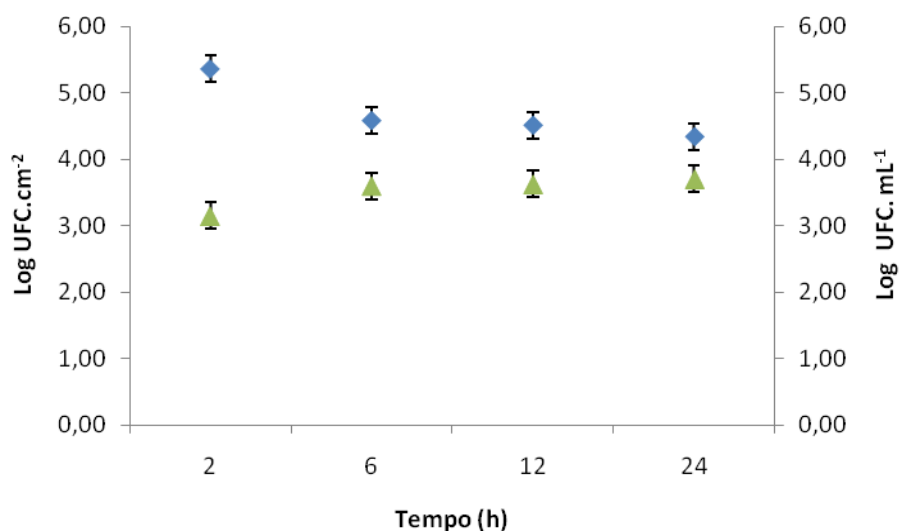


Figura 2 Logaritmo do número de UFC.cm⁻² de endósporos de *Bacillus cereus* aderido em cupons de aço inoxidável com filme condicionante no tempo 2 horas à 24 horas de adesão

A adesão de endósporo atingiu rapidamente, após 2 horas de contato, 3 ciclos Log, na superfície com filme condicionante, atingindo a máxima adesão após 24 horas, 3,7 Log Endósporo . cm⁻² (Figura 2).

Vários trabalhos constataram a capacidade de adesão de endósporos em superfícies inertes, como aço inoxidável, plástico, borracha entre outros (ANDRADE, 1998; BOWER et al., 1996; TE GIFFEL et al., 1995). De acordo com Faille, Fontaine e Beânzech (2001) *B. cereus* demonstra maior capacidade de adesão de endósporos comparada a outras espécies de *Bacillus*. Em estudos de adesão de endósporos com várias cepas de *Bacillus* em aço inoxidável AISI 304, 4 partindo de uma suspensão de endósporos de 7 Log UFC.mL⁻¹, a adesão da cepa de *B. cereus* foi de 4,86 Log UFC. cm⁻², sendo aproximadamente 3 Log UFC.cm⁻² das outras espécies.

Cabral e Andrade (2000) pesquisaram a adesão de endósporos de *B. cereus* em cupons de prova e obtiveram em média 22,08% de adesão, após contato com uma suspensão, em água destilada esterilizada, contendo cerca de 6 Log. endósporos de *B. cereus*.mL⁻¹ durante 12 horas a 8°C.

Sendo os endósporos produzidos por *B. cereus* altamente hidrofóbicos, resultando em uma profunda habilidade de aderir em superfícies inertes comparada às células vegetativas (PARKAR; FLINT; BROOKS, 2004; PENG; TSAI; CHOU, 2002).

3.3 Sanitização dos endósporos aderidos em superfície de aço inoxidável

De acordo com análise de variância, houve diferença significativa (P<0,05) entre os tempos de contato avaliados e entre a eficiência das soluções sanificantes à base de óleos essenciais de *E. cardamomum*, *C. citratus* e a combinação dos mesmos (Anexo C e D) nas duas condições de superfícies de aço inoxidável avaliadas (sem filme condicionante e com filme condicionante).

A Figura 3 demonstra a eficiência da sanitização das superfícies com diferentes óleos essenciais e sua combinação na superfície com e sem filme condicionante.

Observou-se que a solução sanitizantes à base da combinação dos óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* foi a mais efetiva para as condições de superfícies sem filmes de condicionamento, a segunda melhor solução sanitizante foi a base do óleo essencial de *C. citratus* e a menos efetiva a de *E. cardamomum*. Já na superfície com filme condicionante não houve diferença significativa entre as três soluções testadas (solução à base de óleo essencial de *E. cardamomum*, *C. citratus* e combinação) no tempo de 15 minutos e no tempo de 30 minutos a solução sanitizante à base da combinação de óleos essenciais não diferiu significativamente ($P < 0,05$) do sanitizante à base de óleo essencial de *E. cardamomum*, sendo as mais eficiente. Todas as soluções sanitizantes diferiram da solução sanitizante controle ($P < 0,05$) (Figura 3).

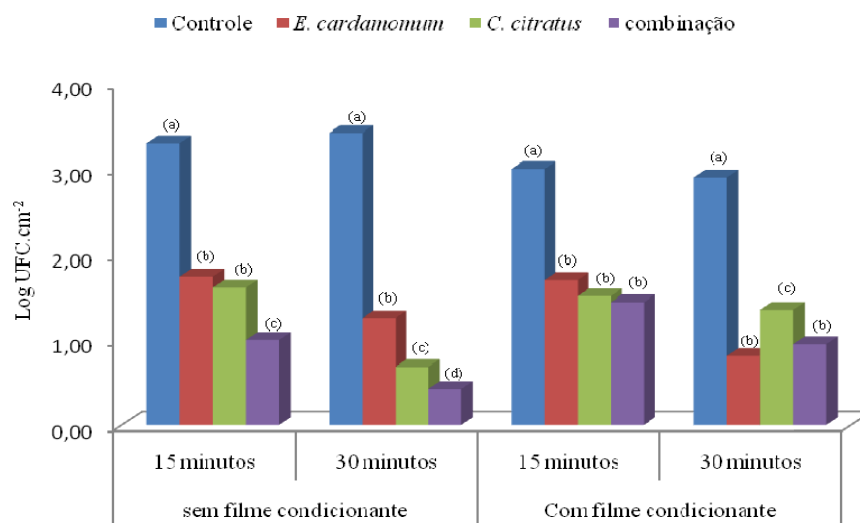


Figura 3 Número Log UFC.cm⁻² de em população de endósporos, (em superfície sem filme condicionante e superfície com filme condicionante) após exposição a soluções sanitizantes à base de óleos essenciais

A efetividade de sanitizantes é frequentemente determinada pela redução do número de endósporos aderidos à superfície, tal resultado pode ser observado pela contagem padrão em placas e pela MEV. As contagens padrões em placas obtidas a partir de cupons de aço inoxidável tratadas com solução sanitizante controle (sem óleo essencial), foram utilizadas para verificar a redução do número de endósporos de *B. cereus* aderidas à superfície de aço inoxidável, após tratamentos com as soluções sanitizantes à base de óleos essenciais. Os cupons tratados com solução controle foram comparados aos cupons com células aderidas sem nenhum tratamento, não encontrando diferenças entre eles ($P < 0,05$).

Os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* e sua combinação foram capazes de reduzir aproximadamente 1,56; 1,69 e 2,30 ciclos Log respectivamente, da superfície sem o filme condicionante após 15 minutos de contato e 2,17; 2,74 e 3 ciclos Log, respectivamente após 30 minutos de contato. Já na superfície com o filme condicionante houve a redução de 1,3; 1,49 e 1,56 ciclos Log após tratamentos dos cupons com os óleos essenciais de *E. Cardamomum*, *C. citratus* e sua combinação, respectivamente após 15 minutos de contato e 2,09; 1,55 e 1,95 ciclos Log, respectivamente para o após 30 minutos de contato. Observa-se ainda que houve efeito sinérgico entre os óleos essenciais de *E. cardamomum*, *C. citratus*, uma vez que o tratamento dos cupons com a combinação dos óleos essenciais promoveu maior redução do número de endósporos aderidos do que aqueles com apenas óleos essenciais de *E. cardamomum* ou de *C. citratus*.

Os dados com relação a sanificação de superfícies aderidas com endósporos com sanitizantes à base de óleos essenciais são escassos na literatura. Entretanto, para eficiência da sanificação com agentes químicos como compostos clorados são mais fáceis de serem obtidos. Te Gifeel et al., (1995) verificaram que endósporos aderidos a discos de aço inoxidável e borracha

tratados com soluções cloradas apresentaram alta resistência, sendo observadas as reduções decimais de 0,4 e 0,7-0,8; para as superfícies de borrachas e aço inoxidável, respectivamente.

A resistência pode estar relacionada com o meio envolvendo a bactéria e a natureza da superfície, as quais possuem fissuras e ranhuras que as protegem, devido à pouca penetração do sanificante. Já os resultados superiores encontrados, empregando soluções à base de óleos essenciais, podem ser explicados pelo potencial de penetração dos óleos essenciais devido às suas baixas tensões superficiais. Quanto mais baixo o valor da tensão superficial, maior será a capacidade da solução em penetrar na superfície, melhorando a capacidade de molhamento (GIRARDINO et al., 2006).

Para haver eliminação de endósporos há necessidade da ocorrência de alterações da sua capa. Essa é dentre as camadas concêntricas dos constituintes do endósporo, aquela que o protege, mas também, é o alvo dos agentes sanificantes. Essa apresenta estrutura rígida e se caracteriza pelo alto conteúdo de cistina. Esse aminoácido não é passível de oxidação e dificulta a ação dos agentes químicos tradicionais (MORAES, et al., 1997).

Os óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* apresentaram terpenoides como seus principais constituintes químicos. No óleo essencial de *E. cardamomum* os componentes encontrados foram o 1,8-cineol, α -terpinil acetato, α -pineno, terpine-4-ol, sabineno, limoneno, α terpineol e mirceno. No óleo essencial de *C. citratus* os componentes foram o neral e o geranial que isomericamente formam o citral, o mirceno, o geraniol, o linalol, (E) β -ocimeno e (Z) β -ocimeno além de outros componentes não identificados em ambos os óleos.

Estudos realizados por Lawrence; Enzo (2009) demonstraram a efetividade esporicida de óleo essencial de cardamomo em endósporos livres, reduzindo o número de endósporos viáveis em 3 Log. Neste mesmo estudo,

testando os componentes majoritários dos óleos essenciais individualmente (terpinen-4-ol, α -terpinil acetato, 1,8- Cineole) e em combinação (terpinen-4-ole α -terpinil acetato; 1,8- Cineole e α -terpinil acetato) verificou-se efeito inferior ao encontrado utilizando o óleo essencial, demonstrando assim que a ação antimicrobiana é dependente dos compostos majoritários e minoritários.

Messenger et al. (2006) encontraram resultados satisfatórios utilizando óleos essenciais de árvore de chá na redução do número inicial de endósporos livres.

Vários estudos foram realizados com antimicrobianos com efeito bacteriostático, isto é, evitando a germinação de endósporos (El MALTI; MOUNTASSIF; AMAROUCH, 2007; MORRIS; HANSEN, 1981; CORTEZZO, SETLOW; SETLOW, 2004; MIKSUSANTI et al., 2009), porém raros são os estudos dos efeitos esporicidas dos óleos essenciais (LAWRENCE; ENZO, 2009).

A importância de encontrar um sanitizante que seja capaz de eliminar os endósporos presentes consiste no fato, de que esses endósporos aderidos na superfície de equipamentos que resistem aos processos de higienização, podem vir, posteriormente, a germinar e comprometer a qualidade dos produtos. Por isso, é importante encontrar um sanitizante que tenha além de uma boa eficiência bactericida, uma eficiência esporicida.

Dentre os fatores que determinam a eficiência dos sanitizantes encontra-se o tempo de contato, assim neste estudo foi avaliado dois tempos de contatos determinados em estudos preliminares. Consta-se que o tempo de contato dos sanificantes à base de óleos essenciais mais efetivo foi o de 30 minutos ($P < 0,05$), para as duas condições de superfícies avaliadas (superfície sem filme condicionante e superfície com filme condicionante).

Na superfície sem filme condicionante, com o aumento do tempo de contado da solução sanitizante à base de óleos essenciais, após 30 minutos de

contato ocorreu aumento de 28%, 58% e 58% da atividade esporicida das soluções de óleos essenciais de *E. cardamomum*, *C. citratus* e da combinação respectivamente, com relação ao tempo de contato de 15 minutos. Já na superfície sem filme condicionante, com o aumento do tempo de contato da solução sanitizante à base de óleos essenciais, no tempo de 30 minutos ocorreu aumento de 52%, 11% e 51 % da atividade esporicida das soluções dos óleos essenciais de *E. cardamomum*, *C. citratus* e da combinação respectivamente, com relação ao tempo de contato de 15 minutos. Como a superfície do endósporo é altamente resistente a maioria dos compostos biocidas, o aumento do tempo de contato, permite maior efetividade dos mesmos.

As eletromicrografias foram utilizadas para visualizar o efeito dos óleos essenciais na morfologia dos endósporos de *B. cereus* (Figura 4). Endósporos não tratados se mostraram de forma oval e com ligeiros cumes (Figura 4 A). Já aqueles tratados com as soluções contendo óleos essenciais apresentavam-se murchos e com sulcos pronunciados (Figura 8 B, C e D).

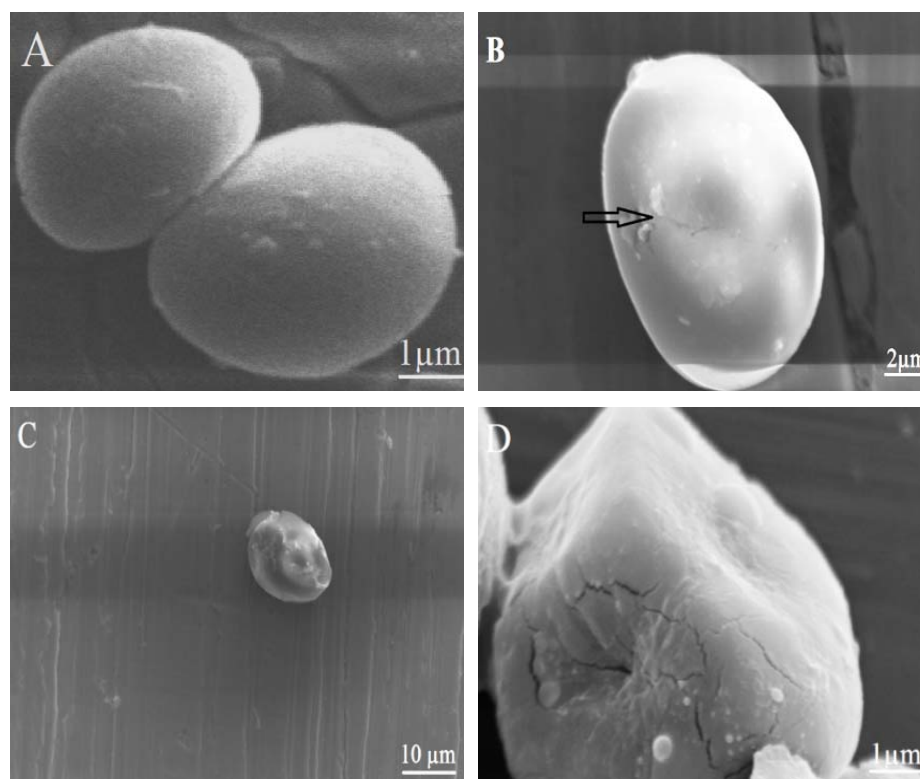


Figura 4 Imagem obtida por microscópio eletrônico de varredura de endósporos de *B. cereus* aderidas em superfície de aço inoxidável. Solução controle (A) e tratadas com óleos essenciais de *C. citratus* (B), *E. cardamomum* (C) e combinação (D)

A MEV evidenciou que a exposição aos óleos essenciais resultou em danos visíveis na superfície dos endósporos. Apesar do teor de água nos endósporos ser muito baixa (YOUNG; SETLOW, 2003), ainda assim algum material intracelular pode ser perdido pelos endósporos tratados, fato sugerido pela sua morfologia danificada. Estudos com células vegetativas sugerem perturbações na estrutura da membrana, aumento da fluidez e rompimento da mesma (GRIFFIN, 1979; CRISTANI et al., 2007). O enfraquecimento da estrutura da capsula do endósporo poderia dessa forma, ser explicado pelo colapso dos endósporos tratados com óleos essenciais.

4 CONCLUSÃO

A superfície do aço AISI 304, #4 utilizado, sem camada condicionante apresentou-se hidrofóbico e com camada condicionante hidrofílica. Essa diferença não influenciou na adesão dos endósporos de *B. cereus*, que foi semelhante nas duas superfícies.

As três soluções sanitizantes testadas promoveram redução significativa dos números de endósporos sésseis.

O procedimento de sanitização utilizando soluções sanificantes à base de óleos essenciais reduziu significativamente o número de endósporos aderidos a superfícies de aço inoxidável, apesar da resistência dos mesmos a grande maioria dos sanitizantes tradicionais. A observação de que a atividade esporicida de óleos essenciais foi reforçada pelo aumento do tempo sugere que mais pesquisas devem ser destinadas a investigar a potencialização do tempo de contato. Os testes poderiam ser ampliados para outras bactérias em forma de endósporos que constituem uma ameaça para indústria de alimentos, tais como *Clostridium*. Em geral, este estudo forneceu evidências claras para a atividade de óleos essenciais de *E. cardamomum* e *C. citratus* contra endósporos de *B.cereus* ATCC 14579.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. 400 p.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Ames, v.61, n.7, p.833-838, July 1998.
- ARAÚJO, E. A. et al. Hidrofobicidade de ribotipos de *Bacillus cereus* isolados de indústria de laticínios. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 20, p. 491-497, July/Sept. 2009.
- BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 169-172, Apr. 2004.
- BERNARDES, P. C. et al. Assessment of hydrophobicity and roughness of stainless steel adhered by an isolate. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n.4, p. 984-992, Oct./Dec. 2010.
- BOARI, C. A. et al. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.
- BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacterial and spores on food-contact surfaces. **Trend in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 71, p. 152-157, May 1996.
- CABRAL, B. P.O.; ANDRADE, N.J. Efeito do fluxo e do tempo de adesão de esporos de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Resumos, vol.1**. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. p. 4.9.
- CORTEZZO, D. E.; SETLOW, B.; SETLOW, P. Analysis of the action of compounds that inhibit the germination of spores of *Bacillus* species. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, n.4, p.725-741, 2004

CRISTANI, M. et al. Interaction of four monoterpene contained in essential oils with model membranes: Implications for their antivacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, June, 2007.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

EI MALTI, J.; MOUNTASSIF, D.; AMAROUCH, H. Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: Toxicity biochemical and histological studies. **Food Chemistry**, London, v. 104, n. 4, p. 1560-1568, Feb. 2007.

FAILLE, C.; FONTAINE, F.; BENEZECH, T. J. Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n.6, p. 892-900, Feb. 2001.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**. Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análise estatísticas e planejamento de experimentos Versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software

GIARDINO, L. et al. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotics. **Journal of Endodontics**. Baltimore, v.32, n. 11, p. 1091- 1093, Nov. 2006.

GRIFFIN, S. Aspects of Antimicrobial Activity of Terpenoids and the Relationship to their Molecular Structure. **Physics Bulletin**, London, v. 30, p. 262, Oct. 1979.

HENRIQUES, A. O.; MORAN Jr, C. P. Structures, assembly and function of the spore surface layers. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 61, p.555-558, Oct. 2007.

HUSMARK, U.; RONNER, U. The influence of hydrophobic electrostatic and morphological properties on the adhesion of *Bacillus* spores. **Biofouling**, Chur, v. 5, n.40, p.335-344, May, 1992

KLAVENES, A. et al. Attachment of *Bacillus cereus* spores with and without appendages to stainless steel surfaces. **Advances in Chemical Engineering**, San Diego, v. 80, part. C, p. 312-318, Dec. 2002.

LAWRENCE, H. A.; ENZO, A. P. Activity of Essential Oils Against *Bacillus subtilis* Spores. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1590-1595, Sept. 2009.

MESSAGER, S. et al. Sporicidal activity of tea tree oil. **Infection Control**, Thorofare, v. 11, n. 4, p. 112-122, 2006.

MIKSUSANTI, B.S. L. J et al. Antibacterial activity of temu kunci tuber (*kaempheria pandurata*) essential oil against *Bacillus cereus*. **Medical Journal of Indonesia**, Indonesia, v. 18, n. 1, p. 10-17, Jan. 2009.

MORAES, M. S. V. et al. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência. Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.17, n.3, p. 325-329, Sept/ Dec. 1997.

MORETRO, T. et al. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica*, among staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.9, p. 5648-5655, Sept. 2003.

NICKAVAR, B.; MOJAB, F.; DOLAT-ABADI. Analisis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. **Food Chemistry**, Washington, v. 90, n.4, p. 609-611, May 2005.

OLIVEIRA, M. M. et al. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potencial. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 97-106, Jan/Mar. 2010.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n.3, p. 546-555, 2011.

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

PARKAR, S. G.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D.; Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 110-116, 2004.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 105-11, 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

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

MORRIS, S. L.; HANSEN, N. Inhibition of *Bacillus cereus* spores outgrowth by covalent modification of sulfhydryl group by nitrosothiol and iodoacetate. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 148, n. 2, p. 465-471, Nov. 1981.

TE GIFFEL, M. C. et al. Sporicidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment. **International Biodeterioration e Biodegradation**, Oxford, p. 421-430, Oct./Dec. 1995.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, p. 526-531, Jul. 2007.

YOUNG, S. B.; P. SETLOW. Mechanism of killing *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 54-67, Jun. 2003.

ANEXO

TABELA 1A Resumo da análise de variância do diâmetro dos halos de inibição, em milímetros (mm), em função dos tratamentos avaliados

Fv	Gl	Qm
Óleos essenciais (O)	2	319,285528**
Concentrações (C)	9	192,906848**
O x C	18	33,543188**
Repetição	2	2,49841**
Erro	58	1,065055**
Total	89	
CV (%)	23,06	
Média Geral	4,4705556	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro,** = significativo ao nível de 1% ($P < 0,01$), pelo teste de F

TABELA 2A Resumo da análise de variância para o número de células vegetativas de *B.cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável sem filme condicionante, transformado por Log (x), em função dos tratamentos aplicados

Fv	Gl	Qm
Sanitizante (S)	3	48,449074**
Tempos de contato(T)	1	12,638269**
S x T	3	1,587097**
Blocos	2	0,054265**
Erro	38	0,015694**
Total	47	
CV (%)	5,90	
Média Geral	2,1235417	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro,** = significativo ao nível de 1% ($P < 0,01$), pelo teste de F

TABELA 3A Resumo da análise de variância para o número de células vegetativas de *B.cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável com filme condicionante, transformado por Log (x), em função dos tratamentos aplicados

Fv	Gl	Qm
Sanitizante (S)	3	64,723774**
Tempos de contato(T)	1	5,747752**
S x T	3	0,447280**
Blocos	2	0,001477**
Erro	38	0,075532**
Total	47	
CV (%)	11,90	
Média Geral	2,3102083	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro;** = significativo ao nível de 1% ($P < 0,01$), pelo teste de F

TABELA 4A Resumo da análise de variância para o número de endósporos de *B.cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável sem filme condicionante, transformado por Log (x), em função dos tratamentos aplicados

Fv	Gl	Qm
Sanitizante (S)	3	16,354572**
Tempos de contato(T)	1	2,650800**
S x T	3	0,553772**
Blocos	2	0,115658**
Erro	38	0,026093
Total	47	
CV (%)	9,62	
Média Geral	1,6783333	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro;** = significativo ao nível de 1% ($P < 0,01$), pelo teste de F.

TABELA 5A Resumo da análise de variância para o número de endósporos de *B.cereus* aderidas aos cupons de aço inoxidável com filme condicionante, transformado por Log (x), em função dos tratamentos aplicados

Fv	Gl	Qm
Sanitizante (S)	3	8,327972**
Tempos de contato(T)	1	1,562408**
S x T	3	0,552714**
Blocos	2	0,358431**
Erro	38	0,051944**
Total	47	
CV (%)	13,33	
Média Geral	1,71	

GL = graus de liberdade; QM = quadrado médio do erro;** = significativo ao nível de 1% ($P < 0,01$), pelo teste de F