



**ALESSANDRA FARIAS MILLEZI**

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILMES  
FORMADOS POR *Staphylococcus aureus* e *Escherichia  
coli***

**LAVRAS – MG**

**2012**

**ALESSANDRA FARIAS MILLEZI**

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILMES FORMADOS  
POR *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Co-Orientadores

Dra. Maria Olívia Pereira

Dra. Maria das Graças Cardoso

Dr. Eduardo Alves

**LAVRAS - MG**

**2012**

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

Millezi, Alessandra Farias.

Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por  
*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*/ Alessandra Farias  
Millezi. – Lavras : UFLA, 2012.

112 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Antimicrobianos naturais. 2. Sanitizantes. 3. Anti-biofilme. 4.  
Bactérias patogênicas. 5. Alimentos. I. Universidade Federal de  
Lavras. II. Título.

CDD – 589.95

**ALESSANDRA FARIAS MILLEZI**

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILMES  
FORMADOS POR *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

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

**APROVADA em 10 de dezembro de 2012.**

<b>Dr. Cleube Andrade Boari</b>	<b>UFVJM</b>
<b>Dr. Disney Ribeiro Dias</b>	<b>UFLA</b>
<b>Dr. Eduardo Alves</b>	<b>UFLA</b>
<b>Dra. Patrícia Gomes Cardoso</b>	<b>UFLA</b>



Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Orientadora

Dra. Maria Olívia Pereira  
Dra. Maria das Graças Cardoso  
Co-Orientadores

**LAVRAS – MG**

**2012**

A todos os pós-graduandos que trabalham com seriedade para produção de pesquisas científicas em prol do avanço da Ciência em todas as áreas do conhecimento.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder capacidade suficiente para desenvolver minhas atividades na Pós-graduação.

À minha família, meus pais Tílio e Anna, minha irmã Andressa, que mesmo distantes, sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis, por todo o incentivo, carinho, paciência e amor.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realização da do Doutorado.

À minha orientadora e amiga Dra Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação, credibilidade, liberdade e confiança durante o doutorado.

À Dra Maria das Graças Cardoso pela co-orientação, ensinamentos e disponibilização do Laboratório para extração dos óleos essenciais.

À minha co-orientadora Dra Maria Olivia Pereira pela disponibilidade, aceitação e orientação da etapa do estágio de doutorado no exterior, na Universidade do Minho, em Braga, Portugal.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos e cooperação.

Aos meus colegas e amigos que também fizeram parte das gestões da Associação de Pós-graduandos da UFLA, pela cooperação, companheirismo e auxílio nas atividades que desempenhamos.

Aos meu amigos brasileiros, na estadia em Portugal (Virginia, Douglas, Junia, Fernanda, Mayron, Adriene, Joyce, Cintia, Vassiliepe, Suely), pela amizade, pelo incentivo, pelas palavras nos momentos difíceis que me transmitiram segurança necessária para enfrentar essa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, que proporcionaram um ambiente tranquilo e descontraído para o trabalho, pelas trocas de experiências e ajuda nos experimentos.

À Rose, que sempre se mostrou prestativa, pela atenção e paciência no atendimento na secretaria do Programa de Microbiologia Agrícola.

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

A todos do Laboratório de Química Orgânica, que ajudaram na etapa de extração dos óleos essenciais.

Aos amigos, que seriam muitos para serem citados aqui, mas cada um sabe a sua grande contribuição nessa maravilhosa estadia de seis anos em Lavras, na UFLA. Agradeço pela companhia, pela descontração, humor e apoio.

Ao meu namorado Hewerton Enes de Oliveira, pelo carinho, amizade, companheirismo e cumplicidade.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no exterior.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse projeto.

## RESUMO

Biofilmes são formas de vida microbiana sésil, caracterizadas pela adesão e produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que protege as células. Entre as bactérias que formam biofilmes em superfícies utilizadas nas indústrias de alimentos, destacam-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estratégias de controle de biofilmes vêm sendo investigadas visando retardar, reduzir, ou mesmo eliminar a sua formação nas superfícies de equipamentos e utensílios. Nesse contexto, pesquisa-se sobre os óleos essenciais e seus compostos individuais, como novas ferramentas com potencial de aplicabilidade nas indústrias de alimentos para o controle de bactérias planctônicas e sésseis. Este estudo teve como objetivos identificar e quantificar os componentes químicos de óleos essenciais extraídos; realizar um screening inicial da atividade antibacteriana de diversos óleos essenciais contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e avaliar o potencial antibiofilme e sanificante de óleos essenciais e alguns compostos majoritários sobre biofilmes simples e mistos formados em microplacas de poliestireno, cupons de polipropileno e cupons de aço inoxidável AISI 304. Os óleos essenciais e seus compostos majoritários demonstraram potencial antimicrobiano significativo ( $P < 0,05$ ) contra as bactérias planctônicas de *E. coli* e *S. aureus*. Contra biofilmes, os resultados mais significativos foram obtidos pela ação antibiofilme de OEs. Obteve-se redução de células viáveis em biofilme de *E. coli* de até 4,17 ciclos log, quando utilizado OE de *Cymbopogon martinii*. OEs também apresentaram capacidade de inibir a formação de biomassa de *S. aureus* e *E. coli*, evitando assim a formação do biofilme. As conclusões desse estudo destacam o promissor papel de agentes derivados do metabolismo secundário vegetal, principalmente os óleos essenciais, como antibacterianos e antibiofilmes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, biofilme, antimicrobianos naturais, sanitizantes

## ABSTRACT

Biofilms are sessile microbial life forms, characterized by adherence to production of extracellular polymeric substances, forming a gelatinous network that immobilizes and protects cells. Among the bacteria that form biofilms on the food surfaces, the highlights are *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Biofilm control strategies have been investigated and tested should delay, reduce, or even eliminate the formation of these communities on surfaces and equipment. Currently there are quite a number of studies aiming to find effective strategies biofilms control. In this context, are the essential oils and their individual components, such as new tools with potential application in the food industry to control planktonic and sessile bacteria. This study aimed to identify and to quantify the chemical components of essential oils; perform an initial screening of the antibacterial activity of various essential oils against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and evaluate the potential antibiofilme and sanitizing of essential oils on single and mixed biofilms formed on polystyrene microplates, polypropylene coupons and coupons of stainless steel AISI 304. The essential oils and their major compounds showed significant antimicrobial activity ( $P < 0.05$ ) against planktonic bacteria *E. coli* and *S. aureus* and evaluate the potential antibiofilme and sanitizing of essential oils on single and mixed biofilms formed on polystyrene microplates, polypropylene coupons and coupons of stainless steel AISI 304. The essential oils and their major compounds showed significant antimicrobial activity ( $P < 0.05$ ) against planktonic bacteria *E. coli* and *S. aureus*

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, biofilm, natural antimicrobial, sanitizer

## SUMÁRIO

### PRIMEIRA PARTE

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1 Biofilmes: conceito, formação e estrutura .....	13
2.2 Composição do biofilme .....	16
2.3 Fatores que influenciam na formação do biofilme.....	17
2.4 Bactérias patogênicas e formadores de biofilmes.....	19
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.5 Mecanismos de resistência de biofilmes .....	22
2.6 Infecções causadas por biofilmes .....	25
2.7 Impactos causados por biofilmes na indústria de alimentos.....	26
2.8 Superfícies envolvidas na formação do biofilme .....	27
2.9 Conceito e biossíntese dos óleos essenciais.....	28
2.9.1 Óleos essenciais como antimicrobianos naturais: novas perspectivas para o controle de biofilmes .....	31
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, JOURNAL OF FOOD SAFETY E ARTIGOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS: BIOFOULING E INTERNATIONAL OF FOOD MICROBIOLOGY .....</b>	
<b>ARTIGO 1 Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>ARTIGO 2 Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Escherichia coli</i> to essential oils.....</b>	<b>44</b>
<b>ARTIGO 3 Antibiofilm and antibacterial effect of essential oils and their major compounds on <i>Escherichia coli</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>63</b>
	<b>91</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

O termo biofilme descreve a forma de vida microbiana sésil, caracterizada pela adesão microbiana com produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. Bactérias em biofilmes apresentam alterações fenotípicas e genotípicas que as diferem das células planctônicas, as quais podem ser estratégias de sobrevivência dos microrganismos as condições ambientais adversas (COSTERTON, et al. 1999).

A formação do biofilme é iniciada por processo reversível, em que células aderem à superfície condicionada. Após iniciar a produção de exopolissacarídeo, crescimento populacional e divisão celular, o processo torna-se irreversível. A formação completa do biofilme é caracterizada por uma comunidade bem estruturada denominada de clímax, e neste estágio, ocorre o desprendimento de células individuais ou em aglomerados que colonizarão outras superfícies. O processo de formação do biofilme pode ser influenciado por fatores ambientais, genéticos e físicos. Quando estabelecido, pode causar tanto benefícios quanto malefícios ao homem e animais (PLOUX et al., 2007).

O biofilme contém áreas intersticiais vazias e vários canais que podem ser comparados a um sistema circulatório primitivo. Estes canais permitem a troca de nutrientes e metabólitos potencialmente tóxicos aos organismos. As células microbianas presentes num biofilme possuem vários tipos de metabolismo, localizando-se células mais ativas (e aeróbicas) na parte

exterior e as bactérias mais inertes (e anaeróbicas) na parte interior da comunidade (CLONTS, 2008).

Entre as bactérias que formam biofilmes nas superfícies utilizadas nas indústrias de alimentos, responsáveis por doenças veiculadas por alimentos, destacam-se *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli* normalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais, nos quais compõe sua microbiota normal e estabelece uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro. Contudo, existem algumas cepas que são extremamente virulentas e capazes de causar doenças graves. *Staphylococcus aureus* é responsável por causar intoxicação alimentar. Esta bactéria está presente na mucosa naso-faríngea de humanos e animais. Organismos presentes no nariz podem contaminar facilmente a pele e, assim, portadores nasais podem ser portadores cutâneos (FUEYO e al., 2005). Condições inadequadas de manipulação e higienização propiciam a contaminação dos alimentos e ambientes, e formação de biofilmes.

Estratégias de controle de biofilmes devem retardar, reduzir, ou mesmo eliminar a formação destas comunidades em superfícies. A escolha de sanificantes deve ser baseada em estudos laboratoriais para a determinação de concentrações adequadas, assim como o tempo de contato e a frequência de aplicação mais corretos. Esses testes devem ser suportados também em estudos com bactérias sésseis e não somente contra planctônicas.

Atualmente há grande número de pesquisas buscando encontrar estratégias efetivas para o controle de biofilmes. Diversos trabalhos têm sido publicados, enfatizando a importância da obtenção de novos produtos com ação sanificante, mais efetivos e com menos toxicidade para humanos. Neste contexto, encontram-se os óleos essenciais e seus componentes individuais, como novas ferramentas com potencial de aplicabilidade nas indústrias de alimentos (MILLEZI et al.; 2012; MILLEZI et al, 2013; SANDASI, 2008).

Os óleos essenciais são produtos voláteis, oriundos do metabolismo secundário vegetal, de plantas aromáticas. São formados por células especiais encontradas em folhas, flores, sementes, caules e raízes. De forma geral, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES, SPITZER, 2004), capazes de agir na superfície celular bacteriana causando, principalmente o comprometimento da estrutura e função membrana plasmática, assim como coagulação o citoplasma (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004)

Diante do exposto, o presente trabalho foi conduzido com os objetivos:

- a) Realizar screening da atividade antibacteriana de óleos essenciais contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*;
- b) Caracterizar os óleos essenciais extraídos quanto à composição química;
- c) Avaliar o potencial antibiofilme e sanificante de óleos essenciais sobre biofilmes simples e mistos de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* formados em microplacas de poliestireno e cupons de polipropileno.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Biofilmes: conceito, formação e estrutura

Os biofilmes são comunidades de microrganismos que se desenvolvem em superfícies de ambientes diversos. Podem ser definidos como formas de existência microbiana espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). Podem ocorrer ou se formar em superfícies de interesse industrial, em próteses dentárias, cateteres, ventiladores e implantes médicos (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2002).

Os biofilmes formam um ambiente dinâmico, no qual células microbianas se encontram em estado de homeostase, organizadas de maneira a utilizar todos os nutrientes disponíveis (SUTHERLAND, 1997). A formação de biofilme inicia-se com a adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície, formando o filme condicionante. Em indústrias alimentícias, resíduos proteicos ou lipídicos de produtos derivados do leite ou de carnes são elementos importantes para formar a camada condicionante (WATNICK; KOLTER, 2000).

A primeira etapa na formação do biofilme, denominada de adesão por colonizadores primários, é fundamentalmente controlada por interações iônicas negativas e ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionador, formado a partir de resíduos do ambiente (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990). Segundo Clonts (2008), a formação e acumulação de biofilmes, dependente de fatores físicos e biológicos, é composta por pelo menos, três etapas distintas (Figura 1):

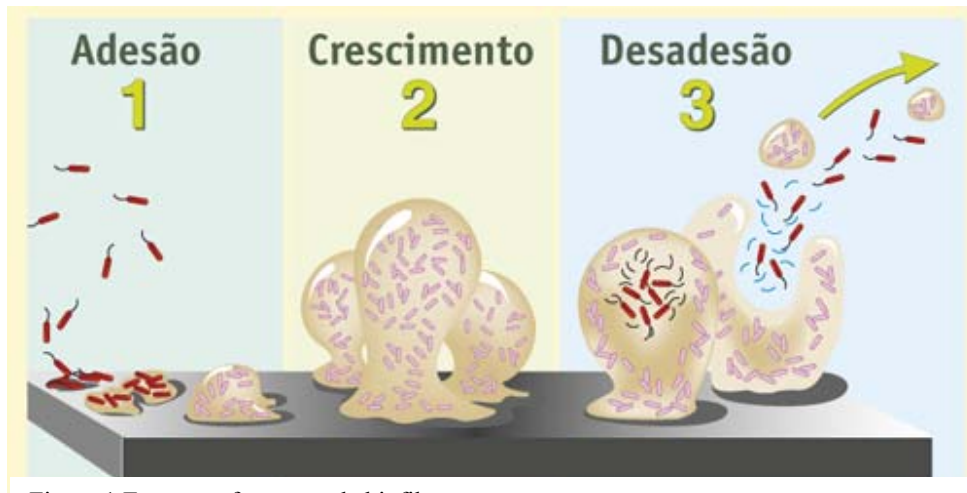


Figura 1 Etapas na formação de biofilmes  
 Fonte: Clonts, 2008

1. Participação de estruturas de adesão (fimbrias ou flagelos) presentes na superfície celular. Estudos feitos com linhagens mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* relataram que quando células não sintetizam flagelos elas são incapazes de realizar as interações iniciais com as superfícies para formação do biofilme.

2. A segunda etapa envolve o crescimento e divisão das células fixas, a custa de nutrientes presentes no líquido, com produção e excreção da matéria exopolissacarídica (EPS) que passa a atuar como substrato para aderência de microrganismos colonizadores secundários. Durante esta etapa, a comunidade cresce com a fixação de outros tipos de células bacterianas e outras partículas flutuantes.

3. Finalmente, quando o biofilme atinge uma etapa de amadurecimento, a massa bacteriana é liberada e os microrganismos desprendidos poderão colonizar novos ambientes causando contaminação.

A consolidação do biofilme maduro ocorre de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias (HEYDORN et al., 2000). A maturidade acontece, principalmente, pelo aumento da densidade populacional e, também, pela pronunciada produção e deposição de polímeros extracelulares, aumentando sua espessura do biofilme (CHENG et al., 2007).

Os exopolissacarídeos são considerados componentes chave que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano, agregado pela formação tridimensional; agem também como adesivos e barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam destacadas pelo fluxo de substâncias. (KIVES et al., 2006). A estabilização estrutural dos exopolissacarídeos de biofilmes ocorre através da formação de pontes iônicas de íons de cálcio e de magnésio e também pelo envelhecimento de cadeias vizinhas de polissacarídeos (WINGENDER et al., 1999).

Boari et al. (2009) destacam como característica da estrutura de biofilmes, a viscoelasticidade e a hidratação, sendo que o grau de elasticidade se relaciona à interação de EPS e ou proteínas com a superfície a ser utilizada. Seu formato, sua espessura, seu alongamento, sua densidade e sua rigidez dependem das características físico-químicas do ambiente e da presença ou ausência de fluxo. Biofilmes formados em fluxo, geralmente tendem a ser mais alongados e rígidos em resposta ao atrito mecânico.

## 2.2 Composição dos biofilmes

Biofilmes não incluem somente microrganismos, mas também todo material extracelular produzido, bem como qualquer material aprisionado dentro da matriz resultante; são constituídos principalmente de água (95%) e matéria orgânica. De 50 a 98% do total da matéria orgânica seca são exopolissacarídeos e o restante microrganismos. Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta debaixo da qual os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos (MACÊDO, 2000).

Biofilmes permitem a coexistência de organismos aeróbicos e anaeróbicos estritos a distâncias de poucas centenas de micrometros um do outro (SCHNEIDER, 2007). Nas camadas inferiores do biofilme estão presentes organismos anaeróbios. Na zona de transição com a parte anaeróbia predominam bactérias facultativas tolerantes a oxigênio, como fermentadoras e denitrificantes, que serão substituídas nas partes mais profundas e com potencial redox mais baixo, por bactérias estritamente anaeróbias, como as sulfato-redutoras e metanogênicas (DAMGAARD et al., 2001; KUHL, JORGENSEN, 1992).

Em todas as teorias propostas para a formação de biofilme, a matriz de glicocálix que compõem o biofilme, possui função importante em sua fisiologia, agindo na aderência das células e como uma barreira de defesa a elas. A matriz ajuda as células do biofilme a resistirem às condições de estresse, como a depleção de água e nutrientes, presença de biocidas e de outros agentes antimicrobianos (KIVES et al., 2006). De acordo com Schneider (2007), a matriz ainda atua como adsorvente e retarda a taxa de difusão de compostos como metabólitos ou aceptores finais de elétrons. A matriz de glicocálix

constitui-se de exopolissacarídeos, os quais são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes, sendo produzidos por grande variedade de microrganismos (SUTHERLAND, 1997). A composição de biofilmes varia muito em função da disponibilidade de matéria orgânica biodegradável para a síntese de biomassa e de exopolímeros (SCHNEIDER, 2007).

Os exopolissacarídeos (EPS) são constituídos principalmente de proteínas, ácidos nucléicos e polissacarídeos, obtidos da lise celular ou pela adsorção do ambiente (HOOD; ZOTOLLA, 1995). A presença dos canais de água no interior do biofilme promove uma efetiva troca de nutrientes e metabólitos, que quando em contato com a água são removidos ou disponibilizados (LINDSAY et al., 2008). Alguns exopolissacarídeos são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano, enquanto outros são sintetizados durante a fase logarítmica ou estacionária (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

### **2.3 Fatores que influenciam na formação do biofilme**

Existem fatores que interferem na adesão microbiana à superfície de contato. Dentre eles incluem-se as características dos microrganismos, como espécie, concentração, produção de EPS, hidrofobicidade, carga elétrica superficial, presença de flagelo, fimbria e pili; as características do material aderente, como carga e microtopografia e as características do meio envolvendo o microrganismo, como pH, temperatura, tempo de contato e agitação (Zottola, 1994).

O pH e a temperatura da superfície de contato influenciam no grau de adesão de microrganismos. *Pseudomonas fragi* mostrou máxima adesão sobre superfícies de aço, quando em pH na faixa de 7 a 8, ótimo para o metabolismo

da célula (STANLEY, 1983). Semelhantemente, o efeito de pH na capacidade de adesão de *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* também foi demonstrada por Herald e Zottola (1988). Estes autores também que *Y. enterocolitica* aderiu melhor sobre as superfícies de aço quando incubada a 21 °C, em detrimento das temperaturas de 35 °C ou 10 °C.

As propriedades físico-químicas da superfície das células são aspectos importantes para a adesão bacteriana. A maioria das células bacterianas são carregadas negativamente, sendo que a carga negativa varia de acordo com com ambientes de crescimento. A carga negativa da superfície da célula é adversa à adesão bacteriana devido à força de repulsão eletrostática, mantendo as células a uma curta distância da superfície. No entanto, a superfície celular bacteriana possui hidrofobicidade devido aos flagelos, às fimbrias e lipopolissacarídeo (LPS) (SHI; ZHU, 2009).

Diversos estudos demonstram a hidrofobicidade da superfície como um fator importante no processo de adesão. A hidrofobicidade representa o grau de capacidade de molhadura da superfície em meio aquoso, sendo a adesão favorecida pelas superfícies hidrofóbicas, as quais possam entrar em contato pela compressão da camada de água e das mesmas (SOUSA; GARCIA-CRUZ, 2004). Desta forma, as propriedades físico-químicas da superfície podem exercer uma forte influência sobre a adesão dos microrganismos, os quais aderem mais facilmente às superfícies hidrofóbicas (plásticos, borrachas) do que às hidrofílicas (vidro ou metais) (RODRIGUES et al., 2009). Entretanto, há estudos que relatam maior aderência das células em superfícies hidrofílicas do que as superfícies hidrofóbicas. Mesmo que observações contraditórias têm sido relatadas, a adesão microbiana parece ocorrer interação hidrofóbica entre a superfície celular e substrato de adesão (DORNAN; CONSTERTON, 2002; SHI, ZHU, 2009).

Estudos de Davies (1998), utilizando biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, indicam um mecanismo com relevante importância, o *Quorum sensing*, para a formação da estrutura em biofilmes. *Quorum sensing* é um sistema intercelular de sinalização que atua na regulação de certas atividades celulares, como a produção de metabólitos secundários, observado em culturas planctônicas (SALMOMD et al., 1995).

Além disso, há proteínas de superfície, tais como Esp (proteína enterocócica de superfície) de *Enterococcus faecalis*, BapA (proteína A associada a formação de biofilme) de *Salmonella* e VP1443 de *Vibrio parahaemolyticus* que apresenta homologia com Bap (proteína associada a formação de biofilme) de *S. aureus* que estão envolvidos na ligação inicial ou desenvolvimento de biofilmes em contato com superfícies (LATASA, et al 2006). Latasa et al (2006) relataram que *S. aureus* são incapazes de formar biofilmes em superfícies de poliestireno quando o gene BAP é perdido, pois a proteína Bap promove a síntese de PIA/PNAG (adesão intercelular polissacarídeo).

#### **2.4 Bactérias patogênicas e formadoras de biofilmes**

A partir de condições favoráveis, quase todos os microrganismos são capazes de formar biofilmes (MCLANDBOROUGH et al., 2006). As bactérias são as que mais frequentemente produzem biofilme, ainda que algumas apresentem, naturalmente, maior aptidão que outras. Adesão de *Salmonella* a superfícies de indústrias de alimentos foi o primeiro relato publicado em relação a formação de biofilme por bactérias de origem alimentar (DUGUID, ANDERSON, CAMPBELL, 1966).

Entre os fatores que as favorecem as bactérias, estão os seus tamanhos reduzidos, elevadas taxas de reprodução, alta capacidade de adaptação e até

mesmo as condições desfavoráveis associadas à produção de substâncias e estruturas extracelulares (CHARACKLIS, 1990). *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Listeria* são alguns dos gêneros mais comuns de bactérias formadoras de biofilmes (BOARI et al., 2009; NOSTRO et al, 2007).

Dentre os microrganismos potencialmente produtores de biofilme, destacam-se aqueles prejudiciais tanto às indústrias alimentícias quanto a de fármacos (CARPENTIER, CERF, 1993; ORTEGA et al., 2010), gerando problemas em equipamentos e contaminando os alimentos e outros produtos, assim como àqueles altamente patogênicos que formam biofilmes em implantes e até mesmo em superfícies bióticas como órgãos (CONSTERTON et al., 1999, DONLAN, COSTERTON, 2002).

### ***2.5 Escherichia coli***

Em 1985, Theodore Escherich descreveu um microrganismo encontrado em grande quantidade nas fezes humanas o qual foi por ele nomeado *Bacterium coli*. No início do século passado, este microrganismo passou a ser utilizado como indicador de qualidade sanitária e na década de 50 foi chamado pelos microbiologistas de *Escherichia coli* tornando-se modelo para diversos estudos na biologia e medicina (KUHNERT et al., 2000).

*Escherichia coli* é um dos microrganismos mais versáteis encontrados na natureza. Morfologicamente, *E. coli* são bacilos Gram negativos retos de dimensões entre 1,1-1,5 µm x 2,0-6,0 µm. Podem apresentar cápsula e possuir flagelos; de ampla distribuição, normalmente coloniza o trato gastrointestinal de humanos e animais onde faz parte da microbiota normal e estabelece uma relação mutuamente benéfica com seu hospedeiro. Contudo existem algumas

cepas que são extremamente virulentas e capazes de causar doenças graves (INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA, 2006).

Em consequência da precariedade das condições higiênico-sanitárias na produção de alimentos, é comum neles observar contaminação de *E. coli*, a qual se dá principalmente por contato com material fecal ou contatos com superfícies contaminadas (NASCIMENTO; STAMFORD, 2000).

Diversos estudos relatam a formação de biofilme de linhagens de *E. coli* patogênicas nas mais variadas superfícies, desde polipropileno até em dispositivos cirúrgicos. De acordo com Soto et al. (2007), biofilmes formados por essa bactéria podem produzir hemolisina causando inflamação nos dispositivos cirúrgicos e como consequência, dificultando ainda mais o tratamento.

## **2.6 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram-positivo, mesófilo, entretanto, pode crescer em ampla faixa de temperaturas. O pH ótimo para o crescimento é de 6-7, podendo crescer entre 4 a 10. Pode desenvolver-se em meio contendo até 20% de cloreto de sódio. É considerado como eubactéria halotolerante, tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência, sendo também empregadas para sua identificação entre outras espécies de estafilococos (MADANI, 1998).

O principal hábitat de *S. aureus*, em humanos e animais, é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal. Organismos presentes no nariz podem contaminar facilmente a pele e, assim, portadores nasais podem ser portadores cutâneos (FUEYO et al., 2005). Lues e Tonder (2007) encontraram

sua incidência em 88% das amostras de mãos de manipuladores de alimentos e Millezi et al. (2007) verificaram níveis de  $1,5 \times 10^3$  UFC/mão em manipuladores de alimentos de uma indústria de processamento de carnes, após a higienização das mãos. Este fato é preocupante já que o microrganismo é reconhecido como um importante agente patogênico, por sua capacidade de causar toxinfecções alimentares (DE BUYSER et al., 2001; JORGENSEN et al., 2005).

*Staphylococcus aureus* forma biofilme facilmente sobre superfícies bióticas e abióticas. É um microrganismo encontrado com alta frequência em leite e superfícies que entraram em contato com ele. Marques et al. (2007) demonstram em seu trabalho que *S. aureus* também, quando em forma de biofilme, se torna mais resistente a agentes sanitizantes. O efeito biocida do óleo essencial de *Satureja thymbra* foi avaliado sobre biofilme multiespécie de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, esse óleo teve efetividade moderada (LEBERT et al., 2007). Contudo, em biofilme monoespécie, *S. aureus* foi completamente erradicado após a utilização de óleo essencial de orégano (NOSTRO et al., 2007).

## 2.7 Mecanismos de resistência de biofilmes

Grande diversidade de microrganismos é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies biótica e abióticas, conferindo-lhes certas vantagens quando comparadas a células planctônicas, como proteção a antibióticos, desinfetantes e ambientes dinâmicos. Segundo Ren et al. (2005), 40% das proteínas da parede celular de células em biofilme diferem das proteínas de células planctônicas, que conseqüentemente leva a não ligação dos antibióticos a alvos específicos.

De acordo com Clonts (2008), os biofilmes são de inquestionável importância para a sobrevivência de microrganismos em vários tipos de

ambientes. Uma das mais importantes descobertas sobre biofilmes é o fato de que várias bactérias transferem entre si diversas características genéticas: a resistência a produtos antibióticos, por exemplo, é transferida a outras células da comunidade através de plasmídeos. Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos são: interferência na síntese da parede celular, ácidos nucléicos e proteínas, e intervenção nas rotas metabólicas. No entanto, a resistência varia de acordo com diferentes espécies microbianas e envolve vários mecanismos (TENOVER et al., 2004; TENOVER, 2006). A resistência a tratamentos com produtos microbiocidas também é possível devido à transferência horizontal de genes, à densidade do biofilme, aos tipos de metabolismo das células e da expressão atípica de genes quando comparada ao fenótipo das células livres das mesmas espécies de organismos (CLONTS, 2008).

As células em biofilmes são muito mais resistentes à desinfecção quando comparadas às células livres (Figura 2), o mecanismo de defesa em biofilmes tem várias origens, incluindo a estrutura da matriz EPS, um micro ambiente com regiões aeróbicas e anaeróbicas e a presença de células que parecem estar numa condição metabólica de dormência (“persister cells”). Por isso, os métodos convencionais de desinfecção são ineficientes contra biofilmes e requerem, por vezes, doses elevadas do desinfetante (CLONTS, 2008).

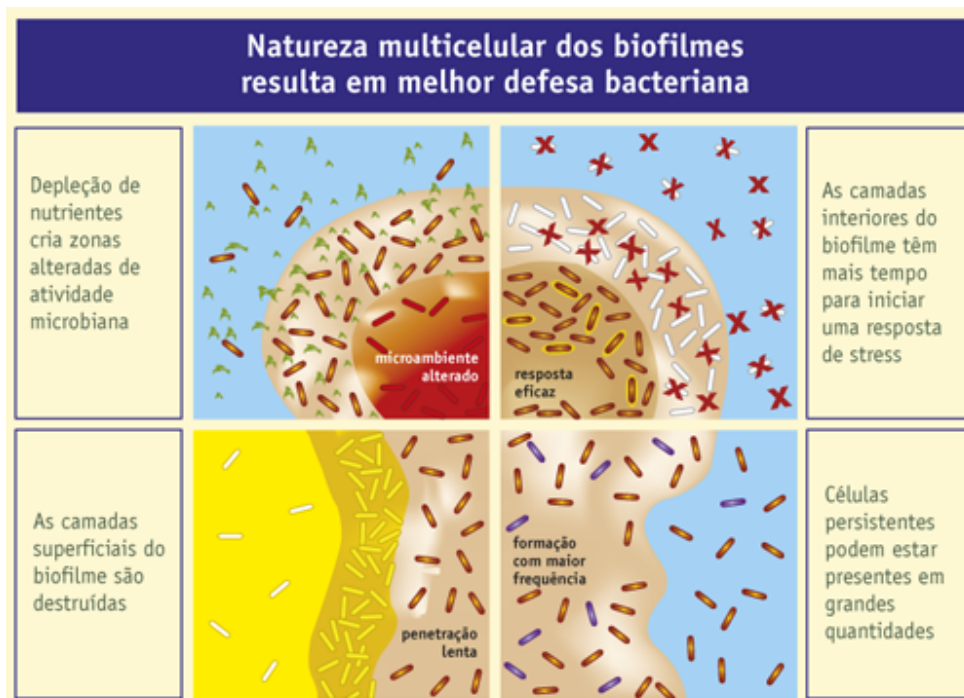


Figura 2 Mecanismos de defesa de um biofilme  
Fonte: Clonts, 2008

Simões et al. (2009) relatam maior resistência dos biofilmes multiespécie do que aqueles monoespécie. Estudo realizado por tais autores confirmou que o biofilme formado por *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens* foi cinco vezes mais ativo metabolicamente do que aquele formado apenas por *P. fluorescens*, que, por sua vez, foi cinco vezes mais ativo metabolicamente que *B. cereus*, apresentando maior biomassa, densidade celular, produção de proteínas e exopolissacarídeos. Tais autores observaram

também maior resistência do biofilme multiespécies quando exposto a soluções *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) e glutaraldeído (GLUT), com uma significativa proporção da população permanecendo no estado viável.

## **2.8 Infecções causadas por biofilmes**

Infecções causadas por biofilmes associados aos dispositivos médicos foram observadas pela primeira vez no início de 1980, quando estudos usando microscopia eletrônica revelaram depósito de bactérias sobre a superfície de dispositivos de longa permanência, tais como cateteres intravenosos e cardíacos (STONDLEY; STONDLEY, 2004).

Paralelamente, infecções com indícios claros de envolvimento de biofilmes microbianos são as endocardites microbianas e fúngicas, a otite média, a prostatite crônica bacteriana, a fibrose cística, a periodontite e a cárie (DONLAN, COSTERTON, 2002). As infecções de implantes artificiais permanentes (válvulas cardíacas, próteses de fêmur e de joelhos, etc.) ou temporários (cateteres, dispositivos intrauterinos, lentes de contato, etc.) representam um segundo grupo de infecções onde o papel dos biofilmes microbianos na infecção é notório (COSTERTON et al., 1999). Cateteres intravenosos, prótese válvulas cardíacas, próteses articulares, diálise peritoneal cateteres, marcapassos cardíacos, líquido cefalorraquidiano shunts e tubos endotraqueais salvam milhões de vidas, mas todos têm o risco intrínseco de infecções associados à formação de biofilmes na sua superfície (MARRIE et al., 1982).

Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* estabelecidos na face externa de lentes de contato é um caso documentado onde o biofilme causa inflamação sem o estabelecimento de contato direto entre o tecido do hospedeiro e o microrganismo patogênico. Neste caso, a superfície artificial da lente de contato

permite o estabelecimento de uma população de *P. aeruginosa* causadora da inflamação no olho do paciente (COWELL et al., 1998).

Além do envolvimento direto em infecções, biofilmes são reservatórios de organismos patogênicos em sistemas de distribuição de água ou em sistemas de condicionamento de ar (PARSEK; SINGH, 2003).

### **2.9 Impactos causados por biofilmes na indústria de alimentos**

Os biofilmes são responsáveis pela maior parte das interferências causadas por microrganismos em processos tecnológicos. Os impactos econômicos causados por biofilmes são estimados em 1% do PIB em países industrializados e podem ser classificados nas seguintes categorias: superdimensionamento de processos ou estruturas para compensar efeitos deletérios de biofilmes, custos de medidas de controles de biofilmes (sistemas de limpeza química ou mecânica, biocidas, etc.), custos de interrupção da produção ou redução da eficiência de processos, aumento de incidência de doenças (inclusão de patógenos em biofilmes de distribuição de água ou de torres de resfriamento) (SCHNEIDER, 2009).

A formação de biofilmes em ambientes de processamento de alimentos eleva as oportunidades para a contaminação microbiana do produto processado e causam deterioração dos alimentos (WARSCHEID; BRAAMS, 2000). A contaminação diminui o tempo de vida útil do produto e é responsável pela transmissão de doenças veiculadas por alimentos.

Em relação à redução da eficiência de processos industriais, os biofilmes diminuem a eficácia da transferência de calor ao se tornarem suficientemente espessos em locais como trocadores de calor (MITTELMAN, 1998). Biofilmes são importantes agentes de biocorrosão, alguns microrganismos em biofilmes

podem catalisar reações químicas e biológicas causando corrosão do metal em ductos e tanques (BEECH, SUNNER, 2004).

### **2.10 Superfícies envolvidas na formação do biofilme**

As falhas nos procedimentos de higienização das superfícies permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular, essa multiplicação dá origem a colônias e formam agregados de massa celular contendo nutrientes, resíduos e outros microrganismos, formando assim o biofilme.

O aço inoxidável AISI 304, utilizado na indústria de processamento de alimentos, é um material ideal para a fabricação de equipamentos devido à sua estabilidade físico-química e alta resistência à corrosão. Entretanto, as bactérias também formam biofilme nessas superfícies. Millezi et al (2013) relataram a formação de biofilme de *Aeromonas hydrophila* após 24 horas de contato do leite UHT contaminado com a superfície de aço inoxidável AISI 304.

Teflon e outros plásticos são usados frequentemente para juntas e acessórios de instrumentos. Estas superfícies tornam-se ásperas ou ao longo do uso, ocorre a formação de fendas que abrigam resíduos formando condições para proteger as bactérias de forças de cisalhamento (SHI, ZHU, 2009).

As características da superfície, como carga elétrica, capacidade de retenção de água, energia livre e topografia, possuem papel importante no processo de adesão (PLOUX et al., 2007). Shi e Zhu (2009) mencionam que as células aderem melhor em superfícies hidrofílicas (aço inoxidável, vidro) do que em superfícies hidrofóbicas (borracha e plásticos). Atualmente o uso de polipropileno na indústria para construir tanques, conexões, tubos e superfícies de processamento de alimentos tem crescido rapidamente (LUGÃO et al., 2007).

De acordo com Pompermayer e Gaylarde (2000), *E. coli* e *S. aureus* aderiram à superfície de polipropileno em 8 horas, a 12 °C e 30 °C, sendo a adesão de *E. coli* foi maior do que *S. aureus* em ambas as temperaturas.

### **2.11 Conceito e biossíntese dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais (OEs) são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Dependendo da família, podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Lauraceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae*) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (*Pinaceae*, *Rutaceae*). Podem ser estocados em certos órgãos, tais como nas flores, folhas, cascas, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, sendo poucos os óleos que apresentam coloração; em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades essas usadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os constituintes químicos dos OEs estão distribuídos em duas classes químicas distintas: terpenóides e fenilpropanóides, sendo os terpenóides produzidos com maior abundância e mais freqüentemente, enquanto que os fenilpropanóides são indispensáveis para características flavorizantes e odorizantes. Outros compostos também fazem parte como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (SIMÕES, SPITZER, 2004).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o acetato e o ácido chiquímico, sendo o último formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, e origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Exemplos de compostos aromáticos originados do metabolismo secundário são os fenilpropanóides que derivam do ácido cinâmico, originado da fenilalanina a partir da ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e apresentam uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligados ao anel aromático (Figura 3) (SANTOS, 2004).

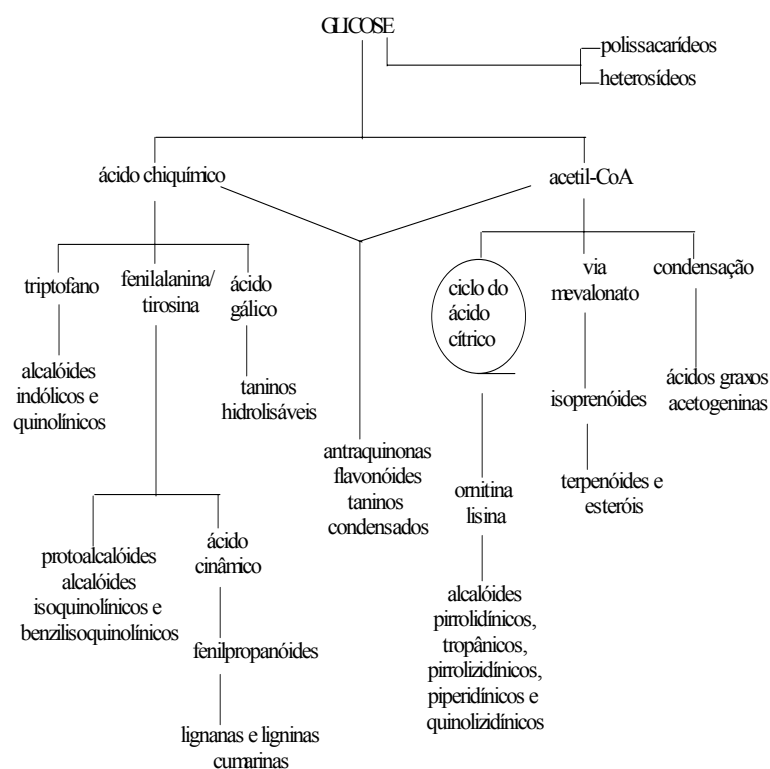


Figura 3 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários  
 Fonte: Santos, 2004.

A síntese de metabólitos secundários pode ser afetada freqüentemente por fatores mecânicos, ambientais, fisiológicos e nutricionais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Entretanto, o método de extração também pode influenciar diretamente na obtenção dos constituintes químicos, sendo os principais métodos utilizados hidrodestilação, prensagem, floração, micro extração de fase sólida, extração de fluido supercrítico, extração com solvente e extração com arraste a vapor d'água (DAWIDOWICZ et al., 2008).

Os OEs desempenham importantes funções biológicas na natureza. Podem agir como antimicrobianos, inseticidas, alopáticos e contra herbívoros. Além disso, podem também atrair insetos para favorecer a polinização. Pelas propriedades apresentada na natureza, têm sido amplamente utilizados. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3.000 OEs, 300 dos quais são comercialmente importantes, principalmente em indústrias farmacêuticas, agrônômicas, de alimentos, sanitárias, de cosméticos e de perfumarias (BAKKALI et al., 2008)

### **2.12 OEs como antimicrobianos naturais: novas perspectivas para o controle de biofilmes**

Biofilmes são extremamente resistentes a processos que normalmente são letais às células planctônicas, por isso, é necessário evitar a adesão de células livres a superfícies. Sanitização freqüente é necessária para prevenir a formação de biofilmes. Quanto mais denso o biofilme, mais difícil será para que ele seja inativado ou removido. Por isso, é importante que o método de sanitização usado seja capaz de reduzir o número das células livres e de prevenir adesão.

Antimicrobianos naturais podem representar uma abordagem interessante para limitar o surgimento e a propagação destes organismos, que atualmente são fonte potencial de contaminação e podem levar à deterioração de alimentos ou transmissão de doenças. Recentemente, há considerável interesse no estudo de materiais vegetais como fontes de novos compostos para transformação em agentes anti-sépticos. Uma abordagem pode ser o uso dos OEs, vários já foram descritos como potenciais agentes antibacterianos (MILLEZI et al., 2012) e contra biofilmes (BUDZYNSKA et al, 2011; MILLEZI et al., 2013; NOSTRO et al, 2007).

Diversos estudos relatam a ação sanificante de OEs sobre biofilmes, Oliveira et al. (2010) relataram a eliminação do biofilme formado por *L. monocytogenes* quando tratado com OEs do gênero *Cymbopogon*. Millezi et al. (2013) obtiveram redução de 4,51 log UFC cm<sup>-2</sup> utilizando óleo essencial de *C. citratus* e 3,84 log UFC cm<sup>-2</sup> quando aplicado o *Thymus vulgaris* contra biofilme maduro de *A. hydrophyla*, formado em cupons de aço inoxidável AISI 304.

As pesquisas sobre a ação antibiofilme de OEs também são importantes, pois se verifica a possibilidade de evitar a formação do biofilme nas superfícies. Budzynska et al, (2011) examinaram a atividade antibiofilme de OEs e seus compostos majoritários sobre *S.aureus* e *E. coli* em superfícies de materiais usados em hospitais, os óleos de *Melaleuca alternifolia* e *Melissa officinales*, assim como os constituintes alfa-terpineol e terpinen-4-ol, mostraram alta atividade antibiofilme. De acordo com esses mesmos autores, a taxa de morte de biofilme formado por *S. aureus* em 24 horas, tratado com os OEs e seus constituintes, revelou a redução parcial (50%) da biomassa metabólica.

O mecanismo de ação dos OEs e seus compostos contra bactérias ainda não está totalmente compreendido, mas especula-se envolver a ruptura da membrana através de produtos lipofílicos (BURT, 2004; MENDONZA et al., 1997). A ação antibacteriana pode resultar em expansão, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, a perturbação de proteínas integrantes de membrana, a inibição da respiração e alteração de processos de transporte de ions, tanto em bactérias Gram-positivas, quanto em Gram-negativas (BREHM-STECHER, JOHNSON, 2003; CARSON et al., 2002; COX et al., 2000; TROMBETA et al., 2005). Compostos fenólicos, como eugenol, podem causar a interrupção da produção de energia devido à inibição da enzima pela oxidação de produtos ou através de outras interações não específicas com proteínas (MASON; WASSERMAN, 2002).

## REFERÊNCIAS

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BOARI, C.A., ALVES, M.P., REIS, V.M., SAVIAN, T.V., PICCOLI, R.H. 2009. 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, 886–895.
- BREHM-STECHER, B. F., JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Oxford, v.47, n.10, 3357–3360, 2003.
- BUDZYŃSKA, A., WIÊCKOWSKA-SZAKIEL, M., KALEMBA, B. D.; RÓ-ALSKA, B. Antibiofilm Activity of Selected Plant Essential Oils and their Major Components. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 60, n. 1, 35-41, 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 3, n. 94, 223-253, 2004.
- CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 75, n. 6, 499–511.
- 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 Chemotherapy**, v. 6, n. 46, 1914–1920, 2002.

COX, S. D., MANN, C. M., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINGTON J. R., WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1; 170–175, 2000.

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

CHRISTENSEN, B. E. & CHARACKLIS, W. G. **Physical properties of biofilms**. In *Biofilms*, pp. 93-130. Edited by W. G. Characklis & K. C. Marshall. New York: Wiley, 1990.

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

COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. and CHENG, K.J. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**. New York, v. 284, 1318–1322, 1999.

DAMGAARD, L. R; NIELSEN, L. P; REVSBECH, N. P. Methane microprofiles in a sewage biofilm determined with a microscale biosensor. n. 6, v. 35, p. 1379-1386, 2001.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P.; The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**. New York, v. 280, n. 10, p. 295-298, 1998.

DAWIDOWICZ, A. L.; RADO E.; WIANOWSKA, D. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. **Talanta**, Amsterdã, v. 76, n. 4, p. 878-884, 2008.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**. Washington, v. 15, n. 2, 167-193, 2002.

DUGUID, J. P., ANDERSON, E. S., & CAMPBELL, I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, London, n. 92, v.1, 107-138, 1966.

FUIEYO, J. M.; MENDONZA, M. C.; MARTÍN, M, C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infection**, Paris, v. 7, n.2, p. 187-194, 2005.

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

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

HERALD, P.J.; ZOTTOLA, E.A. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 51, p. 445-448, 1988.

HEYDORN, A.; ERSBOLL, B. J.; HENTZER, M.; PARSEK, M. R.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**, London, v. 146, n. 10, 2409–2415, 2000.

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

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LOVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, n. 2, p. 267-272, 2005.

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

KÜHL, M; JORGENSEN, B. B. Microsensor measurements of sulfate reduction and sulfide oxidation in compact microbial communities of aerobic biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 4, 1164–1174, 1992.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.24, n. 1, p.107-117, 2000.  
INFORMATIVO CEFAR DE MICROBIOLOGIA. *Escherichia coli*. n. 15 - Mai/Jun/2006.

LATASA, C., SOLANO, C., PENADES, J. R., & LASA, I. Biofilm-associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**, n. 329, v.11, 849-857, 2006.

LINDSAY, D.; NTOAMPE, M.; GRAY, V. M. Biodegradation of sodium benzoate by a Gram-negative consortium in a laboratory-scale fluidized bed bioreactor. **Bioresource Technology**. New York, v. 99, n. 11, p. 5115-5119, 2008.

LUES, J. F. R.; TONDER, I. V. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 4, p. 326-332, 2007.

LUGÃO, A. B.; OTAGURO, H.; PARRA, D. F.; YOSHIGA, A.; LIMA, L. F. C. P.; ARTEL, B. W. H.; LIBERMAN, S.. Review on the production process and uses of controlled rheology polypropylene- gamma radiation versus electron beam processing. **Radiation Physics and Chemistry**, London, v. 76, n. 11-12, 1688-1690, 2007.

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

MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**. Amsterdã, v. 59 p. 139-145, 1998.

MARQUES, S.C. ; RESENDE, J.G.O.S.; ALVES, L.A.F. ; SILVA, B.C. ; ABREU, L.R.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. . Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on surfaces of stainless steel and glass and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 538-543, 2007.

MARRIE, T. J., NELLIGAN, J.; COSTERTON, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of and infected endocardial pacemaker lead. **Circulation**, Dallas, v. 66, n. 6, 1339-1341, 1982.

MASON, T. L., WASSERMAN, B. P. Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds, **Phytochemistry**, Elmsford, v. 26, n. 8, 2197–2202, 1987.

MCLAUHLINA, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDONC, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdã, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.

MENDOZA, L., WILKENS, M., URZUA, A. J. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 58, n. 2, p. 85–88, 1997.

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

MILLEZI, A. F.; TONIAL, T. M.; ZANELLA, J. P.; MOSCHEN, E. E. S.; AVILA, C. A. C.; KAISER, V. L.; HOFFMEISTER, S. Avaliação e qualidade microbiológica das mãos de manipuladores e do agente sanificante na indústria de alimentos. **Revista Analytica**. São Paulo, n. 28, p. 74-79. Abril/Maio 2007.

MILLEZI, A. F., CAIXETA, D. S., ROSSONI, D. F., CARDOSO, M. G., PICCOLI, R. H. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 01-06, 2012.

MILLEZI, A. F., CARDOSO, M. G., ALVES, E., PICCOLI, R. H. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, (in press), 2013.

NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. **Revista de Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.70, p.32-35, 2000.  
NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, London, v. 76, n. 2, p. 125-138, Apr. 2007.

NOSTRO, A.; ROCCARO, A.S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A.; PIZZIMENTI, F.C.; CIONI, P.L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 56, n. 4, p. 519-523, 2007.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon sp.* essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, 549–553, 2010.

ORTEGA MELBA PADUA, TOMOAKI HAGIWARA, HISAHIKO WATANABE, TAKAHARU SAKIYAMA. Adhesion behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v., n. 4, 573–578, 2010.

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

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

REN, D.; ZUO, R.; BARRIOS, A. F. G.; BEDZYK, L. A.; ELDRIDGE, G. R.; PASMORE, M. E.; WOOD, T. K. Differential gene expression for investigation

of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v. 71, n. 7, p. 4022-4034, Jul. 2005.

RODRIGUES, L. R.; SANTOS, L. R.; RIZZO, N. N.; TAGLIARI, V. Z.; OLIVEIRA, M. P.; TRENHAGO, G.; RODEGHERI, S. C.; TAGLIETI, R. M.; DICKEL, E. L.; Nascimento, V. P. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 3, 225-230, 2009.

SALMOND, G. P. C.; BYCROFT, B. W.; LAZDUNSKI, A.; STEWARD, G. S. A. B.; WILLIAMS P. Multiple-acyl-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 64, p. 3480-3485, 1995.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. P. 403-434.

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 467-495.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water research**. Oxford, v. 43, n. 1, p. 229-237, 2009.

SHI, X.; ZHU X. Biofilm formation and food safety in food industries Trends in **Food Science & Technology**. v. 20, n. 9, p.407-413, Set. 2009.

SOTO, S. M.; SMITHSON, A.; MARTINEZ, J. A.; HORCAJADA, J. P.; MENSA, J.; VILA, J. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with prostatitis, urovirulence factors and antimicrobial resistance. **Journal of Urology**, Baltimore, v. 177, n.1, p.365–368, 2007.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, out./dez. 2004.

STANLEY, P. M. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 11, p. 1493-1499, 1983.

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

TENOVER FC, WEIGEL LM, APPELBAUM PC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v.48, n. 1, 275–280, 2004.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, New York, v.119, s.6A, p.3–10, 2006.

TROMBETTA, D. F., CASTELLI, M. G., SARPIETRO, V., VENUTI, M., CRISTIANI, C., DANIELE, A., SAIJA, G., MAZZANTI, B. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents Chemotheaphy**, Bethesda, v. 49, n. 6, 2474–2478, 2005.

ZOTTOLA, A. E. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for food industry? **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.

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

WINGENDER, J., NEU, T.R. AND FELMMING, H.C. **Microbial extracellular polymeric substances - Characterization, Structure and Function**, Wingender, J., Neu, T.R. and Flemming, H.C. (eds), Springer, 1999.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS:  
REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS, JOURNAL OF  
FOOD SAFETY E ARTIGOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS:  
BIOFOULING E INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD  
MICROBIOLOGY**

**ARTIGO 1** Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

**Revista Brasileira de Plantas Mediciniais – Artigo aceito para publicação em  
18 de julho de 2012**

**Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas  
condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

MILLEZI, A.F.<sup>1</sup>; BAPTISTA N.N.<sup>2</sup>; CAIXETA D.S.<sup>3</sup>; ROSSONI D.F.<sup>4</sup>;  
CARDOSO M.G.<sup>5</sup>; PICCOLI R.H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciências Biológicas , Setor de Microbiologia Agrícola,  
Universidade Federal de Lavras - CEP: 37200-000, Lavras-Brasil /  
Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, CEP 4710-  
057, Braga-Portugal, amillezi@yahoo.com.br; <sup>2</sup>Departamento de Ciência dos  
Alimentos - Universidade Federal de Lavras, CEP: 37200-000, Lavras-Brasil,  
<sup>4</sup>Departamento de Ciências Exatas - Universidade Federal de Lavras, CEP:  
37200-000, Lavras-Brasil; <sup>5</sup>Departamento de Química - Universidade Federal  
de Lavras, CEP: 37200-000, Lavras-Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Engenharia  
Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Mato Grosso, CEP: 78060-900,  
Mato Grosso-Brasil

**RESUMO:** Os óleos essenciais são metabólitos secundários vegetais com propriedades biológicas diferenciadas, dentre elas a atividade contra microrganismos, sendo de importante interesse para a indústria de alimentos. As concentrações mínimas inibitórias (CMI) desses óleos para diversas bactérias devem ser determinadas. As CMI variam de acordo com o óleo utilizado, dos compostos majoritários e do tipo de bactéria. Nesta pesquisa, os óleos essenciais das plantas *Satureja montana* L., *Cymbopogon nardus* L. e *Citrus limonia* Osbeck foram caracterizados quimicamente e determinada a CMI sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A CMI para todos os óleos contra *E. coli* foi 1,5%, já *S. aureus* foi sensível a partir da concentração de 5,0% do óleo essencial de *S. montana* e 1,5% foi a CMI obtida quando utilizados os óleos essenciais das outras espécies estudadas. Na constituição química os componentes majoritários para os óleos de *S. montana*, *C. narduse* *C. limonia* Osbeck foram respectivamente o timol, citronelal e limoneno.

**Palavras-chave:** antimicrobianos naturais, bactérias, óleos essenciais

**ABSTRACT:** Essential oils are plant secondary metabolites with different biological properties such as activity against microorganisms, being of major interest to the food industry. The minimal inhibitory concentrations (MIC) of these oils for various bacteria should be determined. The CMI varies according to oil used by the major compounds and phenotypic and genotypic characteristics of bacteria. In this research, the essential oils of plants *Satureja montana* L., *Cymbopogon nardus* L. and *Citrus limonia* Osbeck were chemically characterized and determined the MIC of the bacteria *Staphylococcus*

*aureus* ATCC 2592 and *Escherichia coli* ATCC 25922. The CMI for all oils against *E. coli* was 1.5%, and *S. aureus* was sensitive to the concentration of 5.0% oil of *S. montana* and 1.5% was achieved when the CMI used the essential oils of other plants. In chemically major components for the oils of *S. montana*, *C. nardus* and *C. limonia* Osbeck were respectively thymol, citronellal and limonene

**Key words:** natural antimicrobial, bacteria, essential oils

## INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais (OEs) são definidos como substâncias complexas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário de vegetais. Estes podem ser aplicados em vários segmentos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros, bem como nos setores de higiene pessoal, perfumaria, cosmética, com um mercado mundial gerando em torno de US\$ 1,8 bilhão. A participação do Brasil corresponde a apenas 0,1% deste valor sendo 80% referente ao comércio de óleo de laranja (Simões & Spitzer, 2004; Costa, 2008).

As propriedades antimicrobianas dos OEs de plantas condimentares e medicinais têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa quanto à utilização de aditivos químicos em alimentos. Nos últimos anos tem sido relatado que alguns OEs são capazes de inibir bactérias de origem alimentar e prolongar a vida de prateleira de alimentos processados (Kim et al., 1995; Smith-Palmer et al., 1998). Atualmente várias pesquisas têm investigado OEs como antimicrobianos contra diversas bactérias. Os estudos também enfocam a constituição dessas substâncias relatando a existência de diferenças na composição química entre os óleos extraídos de espécies distintas ou

variedades. Estas variações tendem a influenciar a atividade antimicrobiana dos óleos e são geralmente em função de fatores como: propriedades geneticamente determinadas, idade da planta, sazonalidade, disponibilidade hídrica, temperatura do ambiente onde a planta se desenvolveu, nutrientes disponíveis no solo, altitude e radiação UV (Martins et al., 2003; Gobbo-Neto & Lopez, 2007). Além disso, muitas vezes, os constituintes dos OEs encontram-se em pequenas concentrações ou sua efetividade ocorre por ação sinérgica com vários outros compostos, dificultando os processos de purificação, ou a obtenção dos diferentes compostos puros.

*Cymbopogon nardus*, popularmente conhecido como capim-citronela é uma importante planta aromática, utilizada em soluções repelentes contra insetos e no setor de perfumaria. (Castro & Ramos, 2003). Óleos essenciais extraídos de folhas desse vegetal obtidos na Indonésia, tem como compostos majoritários o citronelal, citronelol e geraniol (Oliveira et al., 2010; Andrade, 1996), sendo bastante utilizados como calmante e no combate a disfunções digestivas (Craveiro et al., 1981; Castro & Ramos, 2003).

*Satureja montana* é comumente conhecida como segurelha de inverno ou segurelha montanhosa é forte erva aromática e tem sido usada a centenas de anos como condimento de alimentos e chás, utilizada na comida mediterrânea, principalmente como tempero de carnes e peixes (Prieto et al., 2007; Silva et al., 2009). Na medicina tradicional e homeopática a segurelha de inverno é utilizada em várias enfermidades, principalmente digestiva, como cólica e diarreia; estimulantes, expectorantes, carminativos, anticatarral e afrodisíaco (Četković et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Os compostos aromáticos, variando entre carvacrol, cimeno e timol, constituem a maioria do óleo essencial de *Satureja montana* (segurelha) (Cávar et al., 2008; Fraternali et al., 2007; Oliveira et al., 2011).

*Citrus limonia* Osbeck, conhecido popularmente como limão-cravo ou limão rosa, é produzido em larga escala no Brasil. As folhas de *C. limonia* são utilizadas para infusões no combate de resfriados e coriza, além disso, o suco é utilizado na medicina alternativa para tratamento de problemas gastrointestinais e contra infecções bacterianas (Spethmann, 2004). Na constituição do OE de *C. limonia* o limoneno é o composto majoritário (aproximadamente 95%) (Fisher & Phillips, 2006).

Dentre as bactérias contaminantes de alimentos e relatadas como agentes causadores de doenças veiculadas por alimentos, pode-se mencionar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A bactéria *S. aureus* é responsável por causar surtos de toxínose, sendo que o principal hábitat em humanos e animais é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal (Fueyo et al., 2005). *E. coli* é agente causador de gastroenterites, a contaminação de se dá principalmente por contato com material fecal ou contato com superfícies contaminadas (Nascimento & Stamford, 2000). Ambos os microrganismos são responsáveis por inúmeros casos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *S. montana*, *C. nardus* e *C. limonia* determinando a concentração mínima inibitória (CMI) sobre *S. aureus* e *E. coli*.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi realizada a extração e caracterização dos óleos essenciais de *S. Montana* L., *C. nardus* L. e *C. limonia* Osbeck, na segunda, foi determinada a atividade antibacteriana dos óleos essenciais.

### **Microrganismos utilizados e padronização do inóculo**

As bactérias utilizadas no experimento foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento, relacionando-se absorvância a 600 nm e UFC mL<sup>-1</sup>. Utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície em meio de cultivo Agar Triptona de Soja (TSA) e o cultivo do microrganismo em caldo infusão cérebro coração (BHI). As leituras de absorvância foram realizadas periodicamente, até obterem-se 10<sup>8</sup>UFC mL<sup>-1</sup>.

### **Material vegetal**

Foram utilizadas folhas de *C. nardus*, obtidas no Horto de Plantas Medicinais de UFLA. As coletas foram realizadas das 8 às 9 horas da manhã, em dias ensolarados e ausentes de chuva, no mês de março de 2010, sob temperatura de, aproximadamente, 20°C (Martins et al., 1994). As folhas secas de *S. montana* foram adquiridas no Mercado municipal de São Paulo - SP e as cascas de *C. limonia* foram coletadas das 8 às 9 horas da manhã, em dias ensolarados e ausentes de chuva, no mês de março de 2010 no pomar da UFLA. As folhas de *C. nardus* e cascas de *C. limonia*, ambas coletadas frescas, foram secas em estufa por 72 horas a 40 °C para posterior extração dos óleos essenciais.

### **Extração e determinação do rendimento dos OEs**

O processo de extração dos OEs foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger modificado. Foram utilizadas 300 g da amostra (*S. montana*), 200 g (*C. citratus*) e 200 g (*C. limonia*). Após 2 horas de extração, o óleo obtido foi coletado e centrifugado, a 321,8 x G, por 5

minutos, em centrífuga Fanem-Baby I Mod 206, e acondicionado em frasco de vidro revestido com papel alumínio, previamente esterilizado (Guimarães et al., 2008). A extração foi realizada em duplicata.

Foi realizada a pesagem dos frascos utilizados para acondicionar os óleos essenciais antes e após a adição dos mesmos, objetivando-se obter a massa extraída em gramas. A partir da massa obtida para extração e da umidade do material vegetal, realizados, ambos, em três repetições, os rendimentos dos óleos essenciais extraídos foram calculados e expressos em base livre de umidade (% v/p BLU).

#### **Determinação da umidade**

Para a determinação da umidade do material vegetal, 5 g de folhas frescas de *S. montana* e *C. nardus* e 5 g de cascas de *C. limonia*, separadamente, foram imersas em 80 mL de ciclohexano em balão volumétrico com capacidade de 250 mL que foi acoplado ao condensador com coletor volumetricamente graduado. A temperatura de aquecimento do balão foi de 100 °C em manta aquecedora. Após 2,5 horas, o volume de água presente nas folhas foi quantificado. A umidade foi calculada a partir do teor de água contido em 300 g da amostra (*S. montana*), 200 g (*C. citratus*) e 200 g (*C. limonia*) (Pimentel et al., 2006).

#### **Quantificação dos constituintes dos OEs**

A avaliação qualitativa dos OE foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), utilizando o aparelho Shimadzu modelo GCMS - QP2010 Plus. As condições operacionais foram: coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB5 (30m X 0,25 mm), o gás carreador utilizado foi o hélio com vazão de 1mL/min, temperaturas de 220 °C

no injetor e 240 °C no detector, programação da coluna, temperatura inicial 40 °C com acréscimo de 3 °C a cada minuto. Os compostos foram identificados por comparações com espectros existentes na biblioteca (Wiley 8 e FFNSC 1.2) e pelo índice Kovat's (Adams, 2007).

### **Determinação da concentração mínima inibitória**

A concentração mínima inibitória dos OEs foi determinada através da técnica de Disco-Difusão conforme NCCLS (M7-A6) (NCCLS, 2003) com modificações. Adicionou-se uma alíquota da suspensão padronizada dos microrganismos ao meio de cultura TSA, à temperatura de aproximadamente 45°C, obtendo-se concentração final de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. A mistura foi homogeneizada e vertida imediatamente em placas de Petri sendo que a CMI foi determinada separadamente para cada bactéria em estudo. Os OEs foram diluídos em dimetilsufóxido (DMSO 0,2%) nas concentrações 0,0 (controle), 1,5; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 25,0 e 50,0%. Foram utilizados 5 µL de óleo essencial para a aplicação em discos de papel filtro (nº 103) medindo 6 mm de diâmetro. Os discos foram colocados sob as placas com meio de cultura TSA contendo os microrganismos. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. O controle negativo foi preparado usando somente o solvente (DMSO 0,2%). A CMI foi avaliada utilizando paquímetro para a medição dos halos de inibição.

### **RESULTADO E DISCUSSÃO**

No Brasil há várias pesquisas que relatam a existência de diferentes características químicas entre os óleos essenciais de espécies distintas e até mesmo entre espécies iguais, porém cultivadas em diferentes regiões geográficas

do globo terrestre. Nas condições utilizadas nesse estudo para extração dos óleos essenciais de *C. nardus*, *S. montana* e *C. limonia*, além da caracterização química, observou-se as variações no rendimento e umidade. O teor de umidade das folhas secas de *C. nardus* e de *S. Montana* foi de 9,0% e 8,0%, respectivamente. Para *C. limonia* obteve-se 7%, enquanto que o rendimento dos óleos foi 1,24%, 1,48% e 1,85%, respectivamente.

Resultados distintos dos obtidos no presente estudo, em relação ao rendimento dos OEs foram encontrados em outros estudos. Marco et al. (2007) examinaram o rendimento do óleo essencial de *C. nardus* cultivados em diferentes espaçamentos, altura e épocas de cortes, encontraram resultados variando de 3,52% a 4,18% de OE na matéria seca. O rendimento de óleo essencial de *S. montana* foi bastante satisfatório (1,25%), quando comparado a 0,47% ao obtido por Oliveira et al. (2011). Segundo Burt (2004), variações no rendimento do OE entre plantas pertencentes à mesma espécie podem ser atribuídas, principalmente, a diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar.

A composição química também pode variar em função de diversos fatores, entre eles as características ambientais e genéticas do espécime. Os compostos majoritários identificados no OE de *S. montana* L. foram timol (15,47%),  $\rho$ -cimeno (11,5%) e carvacrol (9,81%) Resultados semelhantes foram descritos por Oliveira et al (2011) para o óleo de *S. montana*: timol (28,99%),  $\rho$ -cimeno (12,0%) e carvacrol (10,71%). Para *C. nardus*, foram identificados os monoterpenos citronelal (30,48%), citronelol (14,32%) e geraniol (17,12%). Os resultados encontrados por Oliveira et al. (2010) foram: citronelal (34,60%), geraniol (23,17%) e citronelol (12,9%). *C. limonia* apresentou limoneno (33,67%) em maior proporção, seguido pelo  $\rho$ -cimeno (14,16%). Em óleos essenciais de plantas do gênero *Citrus*, o limoneno pode atingir 80% da composição total (Ladaniya, 2008). Alguns fatores como as características

genéticas, a idade da planta e o ambiente, podem ser determinantes na quantidade dos constituintes (Natta et al., 2008). Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), a época em que a planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas, também, as proporções relativas dos componentes da mistura. Tavares et al.(2005) analisaram a composição do OE de três quimiotipos de *Lippia alba* e encontraram variação qualitativa e quantitativa entre os constituintes químicos.

No presente estudo verificou-se que houve atividade antimicrobiana dos OEs extraídos sobre ambas as bactérias. Na Tabela 1 podem-se observar os valores de halos inibitórios para cada bactéria e OE.

Tabela 1 Valores médios de halos de inibição (mm) formados pela ação dos OEs de *Satureja montana*, *Cymbopogon nardus* e *Citrus limonia* Osbeck em diferentes concentrações

Bactérias Concentrações (%)	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	S	C	L	S	C	L
DMSO (0,2%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,5	*	1,00 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>
2,5	*	1,00 <sup>a</sup>	3,66 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>
5,0	1,00 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	4,00 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	2,33 <sup>a</sup>	2,66 <sup>a</sup>
10,0	2,33 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	8,33 <sup>b</sup>	3,00 <sup>a</sup>	3,33 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>
15,0	3,00 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	9,00 <sup>b</sup>	4,66 <sup>a</sup>	3,66 <sup>a</sup>	3,66 <sup>a</sup>
25,0	4,66 <sup>a</sup>	3,66 <sup>a</sup>	9,33 <sup>b</sup>	8,00 <sup>c</sup>	4,00 <sup>a</sup>	6,33 <sup>b</sup>
50,0	2,66 <sup>b</sup>	4,00 <sup>a</sup>	11,66 <sup>b</sup>	15,66 <sup>c</sup>	4,00 <sup>a</sup>	10,0 <sup>b</sup>

S: *Satureja montana*. C: *Cymbopogon nardus*. L: *Citrus limonia*. <sup>a, b, c</sup> Teste Tukey a 95% de significância para diferença de médias das zonas de inibição (mensuradas em milímetros), médias seguidas de mesma letra não diferem entre si significativamente na mesma linha\* ausência de halo inibitório

*Staphylococcus aureus* teve maior sensibilidade ao OE de *C. limonia*. A partir da concentração de 10% esse óleo mostrou-se mais eficiente que os outros. Já o óleo de *S. montana* teve atividade antimicrobiana somente a partir da concentração de 5%. Cávar et al. (2008) apontam resultados diferentes aos desse estudo em relação a atividade antimicrobiana, em que o OE de *S. montana* foi mais eficiente contra *S. aureus* que a *E. coli*. Quanto maior a concentração utilizada, maiores foram os diâmetros dos halos inibitórios (Figuras 1 e 2), pois os componentes dos óleos apresentam-se mais concentrados. Apesar de vários trabalhos relatarem a atividade antimicrobiana de plantas do gênero *Citrus* (Fischer & Phillips, 2006), há poucos com informações da atividade antimicrobiana do OE de *C. limonia*. Pode-se atribuir o efeito antibacteriano dos óleos de *C. nardus* e *C. limonia* às altas quantidades de citronelal e limoneno, respectivamente. O mecanismo de ação desses compostos baseia-se

principalmente em efeitos tóxicos na membrana celular, como a dissipação da força próton motiva, comprometendo a função no que diz respeito à permeabilidade seletiva (Sikkema et al., 1995).

Devido a natureza hidrofóbica e fenólica, timol e carvacrol, compostos majoritários do óleo de *S. montana*, interagem com a camada fosfolipídica da membrana citoplasmática e também com as e proteínas da membrana bacteriana, causando o vazamento do material celular, tais como íons, ATP e ácidos nucléicos (Burt, 2004).

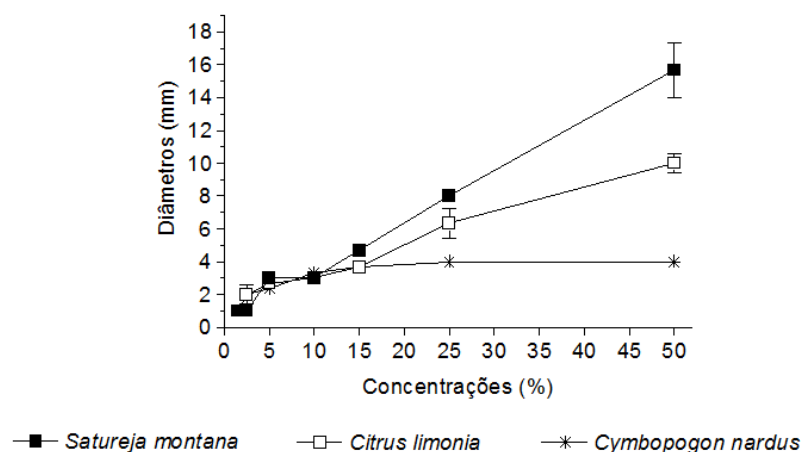


Figura 1 Zonas de inibição (mm) em função das concentrações de diferentes óleos essenciais sobre *Escherichia coli*. Valores médios  $\pm$  Desvio padrão (barras).

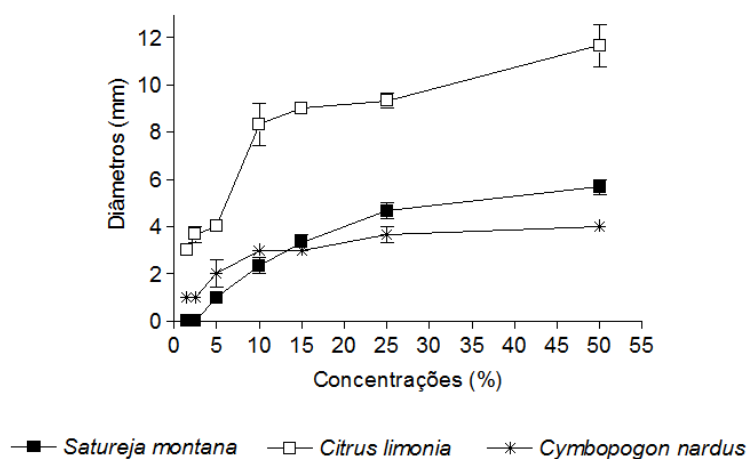


Figura 2 Diâmetros em função das concentrações de óleos essenciais sobre *Staphylococcus aureus*. Valores médios  $\pm$  Desvio padrão (barras).

Estudos têm confirmado a influência dos fatores ambientais como determinantes na ação antimicrobiana dos OE, a exemplo de Celiktas et al. (2007) que relacionaram o aumento da atividade antimicrobiana do OE de *Rosmarinus officinalis* em amostras coletadas na primavera. Moon et al. (2006) verificaram variação significativa no tamanho dos halos de inibição quando testaram a atividade antimicrobiana do OE de diferentes amostras de *Lavandula angustifolia* frente aos mesmos microrganismos. A atividade antimicrobiana de um óleo pode ser, às vezes, bem diferente. Para uma espécie em particular, por exemplo, os valores de CIM determinados para OEs de quimiotipos de *Thymus vulgaris* diferem quando se usam outras linhagens de um mesmo microrganismo (Janssen et al., 1987).

Nguefack et al. (2004) relatam maior atividade antibacteriana do óleo de *C. citratus* quando comparado a *Z. officinales* utilizando a metodologia de difusão em disco. No presente estudo, no qual também foi utilizada metodologia de disco-difusão, a maior ação inibidora foi obtida pelo óleo OE do *S. montana* contra *E. coli* e *C. limonia* para *S. aureus*. Diferenças entre resultados podem ocorrer mesmo quando se utiliza a mesma metodologia, pois existem também diferenças quanto à sensibilidade de linhagens de um determinado microrganismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal.

## CONCLUSÃO

Os OEs apresentaram ação antibacteriana, sendo que *S. aureus* teve maior sensibilidade ao óleo essencial de limão e *E. coli* ao óleo de *S. montana*. Os resultados *in vitro* sugerem o uso potencial destes óleos como uma alternativa aos antimicrobianos e conservantes sintéticos.

**Agradecimentos:** À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro na execução do projeto.

## Referências Bibliográficas

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils componets by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing.2007, 803p.

CASTRO, L.O.; RAMOS, R.L.D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, capim-cidrô, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J. F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Eluonurus candidus* (Trin.) Hack., capim limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver.** Porto Alegre: FEPAGRO, 2003, 23p.

CÁVAR, S. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**. v.111, 648-53, 2008.

CELIK TAS, O.Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry** v.100,p.553-9, 2007.

ĆETKOVIĆ, G.S. et al. HPLC Screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.30, p.293-306, 2007.

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

CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste.** Fortaleza: UFC, 1981, 210p.

FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**. v.101, 1232-40, 2006.

FRATERNALE, D. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Satureja montana* from central Italy. **Chemistry of Natural Compounds**, v.43, 622-8, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**, v.30, 374-81, 2007.

- GUIMARÃES, L.G.L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*(D.C.) Stapf). **Química Nova**. v.31, n.6, p.1476-80, 2008.
- JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.C; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. In: Aspects of the test methods. **Plantas Mediciniais**. v.53, 395-98, 1987.
- KIM, J.M. et al. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, v.60, 1364-8, 1995.
- LADANIYA, M. **Citrus fruit: biology, technology and evaluation**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2008, 558 p.
- MARCO, C.A. et al. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, v.25, n.3, p.429-32, 2007.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2003, 220p.
- MILLEZI, A. F., et al. 2012. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, pp. 0-0. Epub Feb 24, ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/S010120612012005000021>.
- MILLEZI, A. F., et al. 2013. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Brazilian Journal Microbiology*, xx, xxx-xxx.
- MOON, T.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. **International Journal Aromatherapy**, v.16, p.9-14, 2006.
- NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. **Revista de Higiene Alimentar**. v.14, p.32-5, 2000.

NATTA, L. et al. Essential oil from five Zingiberaceae for anti food-borne bacteria. **International Food Research Journal**, v.15, n.3, p.337-46, 2008.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**.

Approved standard M7-A6, Wayne, Pa, USA, 2003.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by low cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, p.395-400, 2004.

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**, v.21, p.549-53, 2010.

OLIVEIRA, T.C.et al. Antimicrobial activity of *Saturejamontana* 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**. v.144, n.3, p.546-55, 2011.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**. v.269, 8022-8, 1994.

PRIETO, J.M. et al. In vitro activity of the essential oils of *Origanum vulgare*, *Saturejamontana* and their main constituents in peroxynitrite-induced oxidative processes. **Food Chemistry**. v. 104, p.889-95, 2007.

PIMENTEL, F.A. et al. A convenient method for the determination of mixture in aromatic plants. **Quimica Nova**, v.29, n.2, 373-5, 2006.

SPETHMANN, C.N. **Medicina alternativa de A a Z**. 7.ed. Uberlândia: Natureza, 2004, 392p.

SILVA, F.V.M. et al. Phytochemical profile and anticholinesterase and antimicrobial activities of supercritical versus conventional extracts of *Saturejamontana*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, p.11557-63, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.;

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.;

PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004, p. 467-95.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v.18, 463-70, 2001.

TAVARES, E.S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, p.1-5, 2005.

**Artigo 2 - Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils**

Journal of Food Safety 32 (2012) 351–359, 2012.

**Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils**

A.F. MILLEZI<sup>1,4,5</sup>, M.O. PEREIRA<sup>4</sup>, N.N. BATISTA<sup>2</sup>, N. CAMARGOS<sup>2</sup>, I. AUAD<sup>2</sup>, M.D.G. CARDOSO<sup>3</sup> and R.H. PICCOLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamentos de Ciências Biológicas – Setor de Microbiologia Agrícola,  
<sup>2</sup>Ciência dos Alimentos e <sup>3</sup>Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras,  
Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga,  
Portugal

<sup>5</sup>Corresponding author. F.M. Millezi, Avenue Silvio Minecucci, 1695/304,  
Lavras 37200-000, Minas Gerais, Brazil. TEL: 55-35-91027008;  
FAX: 55-35-38291401; EMAIL: [amillezi@yahoo.com.br](mailto:amillezi@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms formed on the polypropylene surface. The cultures were developed for 240 h, planktonic growth was characterized by colony-forming unit (cfu)/mL and biofilms was characterized by quantifying biomass and cfu/cm<sup>2</sup>. Essential oils (EOs) of citronella and lemon were extracted by hydrodistillation and characterized by gas chromatography. Biofilm formation occurred after 3 h of contact. In dual-species biofilms, there was competition; *S. aureus* was the number of viable cells damaged by *E. coli* ( $P < 0.05$ ). The EOs disinfectant action was similar in biofilms monospecies, viable cells and biomass decreased significantly. Dual species biofilms were more resistant to EOs. The action EOs on biofilm suggest promising alternatives to sanitize industrial polypropylene surfaces.

## PRACTICAL APPLICATIONS

Historically, the majority of new drugs has been generated from natural products (secondary metabolites) and from compounds derived from natural products. The extracts of higher plants have been and still are widely used to obtain substances with antimicrobial action. However, their low concentration in the extract often makes the purification processes or the synergistic action of the different compounds unfeasible, causing major problems for industries. Seeking to reduce the parameters involved in the isolation and purification of compounds, these essential oils (EOs) have been studied. They present high antimicrobial efficiency, and in appropriate concentrations they are considered safe. The antimicrobial activity of EOs was showed that such substances can be used with sanitizing agents in industrial surfaces against bacterial biofilms.

However, this line of research is still very new, so it is important to continue research for the development of industrial sanitizing with EOs.

## **INTRODUCTION**

The term biofilm was created to describe the sessile form of microbial life characterized by adhesion of microorganisms to biotic or abiotic surfaces, with consequent production of extracellular polymeric substances (Nikolaev and Plakunov 2007). In just two decades, we have learned that biofilms comprise highly structured matrix-enclosed communities (Costerton and Stewart 2001) whose cells express genes in a pattern that differs profoundly from that of their planktonic counterparts. Because direct observations show that biofilms constitute the majority of bacteria in most natural (Costerton *et al.* 1978) and pathogenic ecosystems (Costerton *et al.* 1999), it seems unwise to continue to extrapolate from planktonic cultures in studies of these systems.

In the food industry, biofilms cause serious engineering problems such as impeding the flow of heat across a surface, increases in fluid frictional resistance of surfaces, and increases in the corrosion rate of surfaces leading to energy and production losses (Verran and Jones 2000). Pathogenic microorganisms grown on food surfaces and in processing environments can cross-contaminate and cause post processing contamination (Ganesh and Anand 1998). Several microorganisms are capable of participating in the adhesion processes and biofilm formation. In the food industry, these microorganisms can be classified as spoilage and pathogenic. Among the pathogenic microorganisms, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* are able to form biofilms, which are complex structures consisting of surface-attached bacteria

surrounded by a self-produced extracellular polymer matrix (Kania *et al.* 2008; Naves *et al.* 2008).

Natural drugs could represent an interesting approach to limit the emergence and the spread of these organisms, which currently are potential sources of contamination that can lead to food deterioration or transmission of foodborne diseases. Recently, there has been considerable interest in the study of plant materials as sources of new compounds for processing into sanitizer agents. One approach may be the use of essential oils (EOs) that have been shown to be potential antibacterial agent (Nostro *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2010b; Millezi *et al.* 2012). The results obtained are promising yet divergent. According to Chorlianopoulos *et al.* (2008), the information available on the use of EOs as disinfectants is still limited, pointing to the need of further studies.

This work aimed at testing the susceptibility of biofilms formed by monospecies and dual-species of *S. aureus* and *E. coli* to EOs of lemon and citronella.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experiment Execution Sites**

The experiment was carried out at the Federal University of Lavras (Lavras – MG, Brazil), in the Food Microbiology, Chromatography and Organic Chemistry, and in the University of Minho (Braga, Portugal), in Applied Microbiology Laboratory.

### **Extraction, Identification and Quantification of the Compounds of EOs**

Fresh leaves of citronella and fresh peels of lemon were collected From Medicinal Plant Nursery of the Federal University of Lavras in Minas Gerais, Brazil. The EOs were extracted by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus (Sovereing, São Paulo, Brazil). Plant materials were chopped and placed with water in a 4-L volumetric flask. The flask was coupled to the modified Clevenger apparatus, and the extraction was performed for 2.5 h with the temperature maintained at approximately 100C. The hydrolate obtained was centrifuged at 321.8  $\times$  g for 5 min, with the EO being removed with a Pasteur pipette (Labor Import, Osasco, Brazil) and stored at refrigeration temperature in glass flasks wrapped in aluminum foil (Guimarães *et al.* 2008). Qualitative evaluation of EO was performed to gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS) using the Shimadzu model GCMS – QP2010 Plus apparatus (São Paulo, Brazil). The operational conditions were: fused silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm) with DB5 bonded phase, helium carrier gas, flow rate 1 mL/min, injector temperature 220C, detector temperature 240C, and oven temperature program 40C, increasing 3C/min. The compounds were identified by comparisons with spectra existing in the library Wiley 8 and Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds 1.2, and by the Kovat's index (Adams 2007).

### **Microorganism Standardization**

The microorganisms used were *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 and *S. aureus* ATCC 24922. The standardization of the number of cells was determined by growth curve. Throughout the experiment, the strain was stored under refrigeration in freezing culture medium (15 mL glycerol, 0.5 g bacteriological peptone, 0.3 of yeast extract and 0.5 g NaCl, per 100 mL of distilled water, with the final pH 7.4) and stored at -80°C. For strain reactivation and use, an aliquot of the freezing culture medium was transferred to test tubes containing Trypticase Soy Broth (TSB, Merck, Lisbon, Portugal), with two subcultures at 37°C for 24 h. The culture was streaked in Trypticase Soy Agar (TSA, Merck) added to Petri dishes and incubated at 37°C for 24 h. Of the colonies formed on the TSA surface, some were removed and transferred into an erlenmeyer flask containing 150 mL of TSB, which was incubated at 37°C until approximately  $10^5$  UFC/mL.

### **Preparation of the Coupons**

In order to initiate the bacterial adhesion stage, the polypropylene coupons were previously hygienized and sterilized in autoclave. For cleaning, the coupons were immersed in 0.3% peracetic acid at 50°C for 30 min under 50 rpm agitation. After, they were immersed in sterile distilled water at 80°C for 15 min. The coupons were autoclaved at 120°C for 20 min.

### **Biofilm Formation on Polypropylene**

For biofilm formation, a Petri dish (140 x 20 mm) containing 80 mL of TSB and polypropylene coupons (10 x 20 mm) was used. After the addition of

bacterial cultures (concentration  $10^5$  colony-forming unit [cfu]/mL), the system was incubated at 37C under orbital agitation (50 rpm). Every 48 h, the TSB used as substrate was replaced in the same amount of sterile TSB. At each medium change, the coupons were immersed in sterile water; no adherent cells were removed, and the Petri dishes were replaced by sterile dishes. This procedure was carried out to complete 240 h of cultivation. To differentiate the process of adhesion and biofilm, the value of  $10^5$  cfu/cm<sup>2</sup> as biofilm, which is intermediate to that proposed by Andrade and Macêdo (1998), who set the value of  $10^7$  cfu/cm<sup>2</sup>, and presented by Wirtanen *et al.* (1996) and Ronner and Wong (1993), which they regard as a biofilm adherent cell number of  $10^3$  and  $10^5$  cfu/cm<sup>2</sup>, was considered. In monospecies *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 were cultured in the previous system, individually, in the approximate amount of  $10^5$  cfu/mL. In dual-species, *S. aureus* ATCC 25923 and *E. coli* ATCC 25922 were inoculated together in the approximate concentration of  $10^5$  cfu/mL of each microorganism.

### **Quantification of Cultivable Planktonic Cells**

The planktonic cells number was determined, and aliquots of 1 mL of TSB were removed from the dish after 3, 48, 96, 144, 192 and 240 h. Every 48 h, the plates were replaced by other sterile, and TSB used as the substrate was replaced in the same amount of sterile medium, following the same procedure until the 10th day incubation. Serial dilutions up to 10<sup>-10</sup> were carried out in test tubes containing 900 mL of peptone solution. Aliquots of 100 mL of each dilution were inoculated in Petri dishes containing TSA using the spread plate technique. The Petri dishes were incubated at 37C for 24 h. The ability to detach

and contaminate the sterile substrate was named as biotransfer potential (Oliveira *et al.* 2010a). The values were expressed total number of cfu/mL.

### **Quantification of Cultivable Cells in Biofilm**

Cells adhered on polypropylene coupons were removed using sterile swabs performing standardized smear (100 times) on the coupon on both sides after 240 h of cultivation. The swabs were transferred to tubes containing 0.1% peptone water (v/v) and agitated in a vortex for 2 min. After this procedure was performed, a serial dilution and aliquots of 0.1 mL were removed. The number of viable cells was determined by eosin methylene blue agar to count *E. coli* and Baird Parker agar for *S. aureus* using the technique of surface scattering. The dishes were incubated at 37C/24 h. After, this period took place on plate count, and the values were expressed in total number of cfus per unit area ( $\log \text{cfu/cm}^2$ ) (Silva *et al.* 2010). All assays were performed in three separate occasions.

### **Biomass Quantification by Crystal**

#### **Violet Staining**

Biomass of single and co culture biofilms were quantified by crystal violet (CV) staining method adapted from Stepanovic' *et al.* (2000). For fixation of the adhered cells and biofilms, the coupons were added in 12-well microtiter plates (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium), and 2 mL of 99% methanol (Vaz Pereira, Lisbon, Portugal) was added to each well; after 15 min, the methanol was removed, and the coupons were allowed to dry about 25C.

Then, 2 mL of CV stain (1% v/v) (Merck) were added to all wells. After 5 min, the excess of CV was removed, and the coupons were gently washed in water. Finally, 1 mL of acetic acid (33% v/v) (Pronalab, Lisbon, Portugal) were added to all wells to dissolve the CV stain, and the absorbance was measured at 570 nm. All assays were performed in triplicate and on three separate occasions.

### **Polypropylene Coupon Treatment Using**

#### **Disinfectant Solutions**

For the elaboration of the disinfectant solutions based on EOs and control solution (without the EOs), the following proportions and dilutions suggested by Oliveira *et al.* (2010b) were used; with modification, the ethanol was substituted by dimethylsulfoxide (DMSO) 2%. The saline solution was used to provide osmotic concentration adequate to the bacterial cell so that the bactericide effect would be attributed only to the EOs (Oliveira *et al.* 2010b). Tween 80 was used, as well as DMSO, to dilute the EOs. The EOs were initially diluted with DMSO, followed by the addition of the saline solution with 0.5% (v/v) of Tween 80. The amount of EO used in each disinfectant solution was based on previous studies about the bacteriostatic effect (Millezi *et al.* 2012) on planktonic cell (data not shown) in concentration of 1.0%. After 240 h, the coupons with biofilms were removed from Petri dishes and immersed in 0.1% peptone water for two consecutive times for the removal of planktonic cells. After, the coupons were dipped in sanitizing solutions for 15 min at 25C. After the treatment, the coupons were removed from solutions and subjected to smear performed with sterile *swabs*. The adhered cells were quantified and expressed in cfu/cm<sup>2</sup>.

### **Statistical Analysis**

The data were analyzed using the Prism software package (GraphPad Software, San Diego, CA). T-test and one-way analysis of variance test were performed, and  $P < 0.05$  was considered significant.

## **RESULTS**

### **Characterization of EOs and Disinfectant action on Biofilms Single and Co cultive**

The chemical analyses showed that the monoterpenes were major chemical constituents. For EO citronella, the major constituents found were citronellal (30.48%), geraniol (17.12%), citronellol (14.32%) and elemol (6.11%) (Table 1). Limonene (33.67%), r-cimene (14.16%), carvone (9.50%) and ciclohexanodiol (7.67%) were the main components for lemon (Table 2).

Table 1 Chemical composition of the *Cymbopogon nardus* essential oil

Constituents	Tr*	%†
Mircene	12.468	0.23
Limonene	13.856	4.19
Eucaliptol	13.962	0.17
Linalool	16.600	0.86
Isopulegol	18.307	2.72
Citronellal	18.671	30.48
Citronellol	21.354	14.32
Neral	21.772	0.67
Geraniol	22.306	17.12
Geranial	22.807	0.87
Citronelil acetate	25.580	2.55
Eugenol	25.756	1.28
Acetato de geranil	26.582	1.91
Elemeno	26.935	1.22
germacrene	29.798	2.08
murolene	30.366	0.46
$\alpha$ – cardinene	30798	0.65
$\beta$ – cardinene	31.066	2.10
Elemol	31,852	6.11
Naftalemol	32,657	1.64
Others		8.37
Total	–	100.00

\* Retention time

† Percentage of the relationship between area and peak

Table 1 Chemical composition of the *Citrus limonia* Osbeck essential oil

Constituents	Tr*	%†
$\alpha$ -pinene	10.257	1.03
$\beta$ -pinene	11.851	4.30
p-cimene	13.702	14.16
limonene	13.866	33.67
menthol	17.365	1.26
pinocarveol	18.035	4.45
pinocarvone	18.926	1.39
mirtenol	20.172	4.20
t – carvoel	20.986	5.65
c-carveol	21.405	2.21
carvone	21.868	9.50
ciclohexanodiol	25.155	7.67
Others		10.51
Total	–	100.00

\* Retention time

† Percentage of the relationship between area and peak

### **Growth of Planktonic Cells Associated with the Capacity of Biofilm Formation**

The *E. coli* and *S. aureus* planktonic monospecies growth was similar, with no significant difference ( $P > 0.05$ ) and observed similar growth of both bacteria both in co-culture than in monospecies (Fig. 1a). The growth of *E. coli* along the 240 h provided monospecies no significant differences ( $P > 0.05$ ). *S. aureus* after 3 h differed from 48, 96, 144, 192 and 240 h ( $P < 0.05$ ). However, the results shown in Fig. 1b suggest that there was a relationship of competition

in which *E. coli* predominated significantly in all times over *S. aureus* ( $P < 0.05$ ). In periods 3, 48 and 96 h, there was a slight increase in the number of planktonic bacteria of *E. coli*, and in 144 and 192 h, there was a decrease in the number of viable cells of *S. aureus* probably prejudiced by *E. coli* (Fig. 1b).

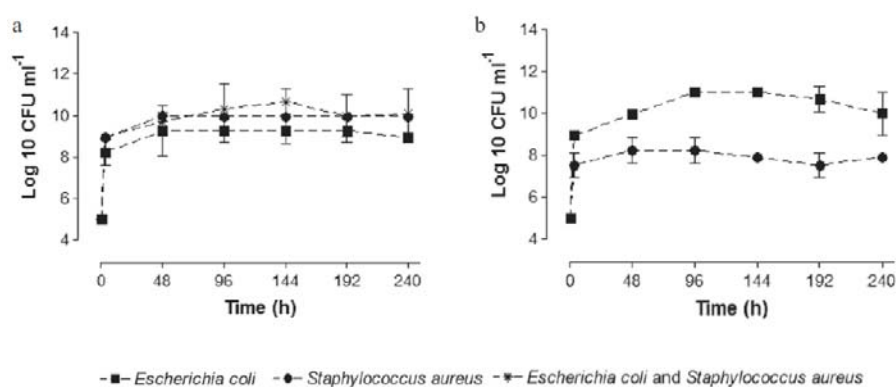


Figure 1 Cultivable planktonic cells of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in trypticase soy broth under cultivation simple and mixed (a) and only mixed (b) at 37°C over 240 h

After 48 h of culture was observed the ability of microorganisms adhered in the coupons detached and contaminates the sterile medium, thus leading to potential biotransfer. The *E. coli* monospecies biofilm at 3 and 48 h was statistically different from 192 and 240 h ( $P < 0.05$ ), and 96, 144 and 192 h were different from 240 h ( $P < 0.05$ ). A monoespecies biofilm *S. aureus* formation in 3 h was significantly different from all other periods. For the

biomass-accumulated simple biofilm of both bacteria, 3 h was statistically different only at 192 and 240 h, and the times 48, 96, 144 and 192 h were different from 240 h (Fig. 2).

After 3 h of cultivation, both *E. coli* and *S. aureus* biofilm formed on the surface of polypropylene, both in monoespecies and in dual-species (Fig. 2).

After 240 h of *E. coli* simple biofilm formation, we observed a significant increase only between 3 and 144 h, 3 and 192 h, and 3 and 240 h ( $P < 0.05$ ).

In *S. aureus*, simple biofilm after 3 h differed, which was obtained after 48, 96, 144, 192 and 240 h ( $P < 0.05$ ). In the dual-species the cfu/cm<sup>2</sup> number obtained after was different from just 3 and 144 h ( $P < 0.05$ ). Unlike biofilms constituted by bacteria in dual-species biofilm, both *E. coli* and *S. aureus* showed no significant differences in growth along the 240 h ( $P > 0.05$ ).

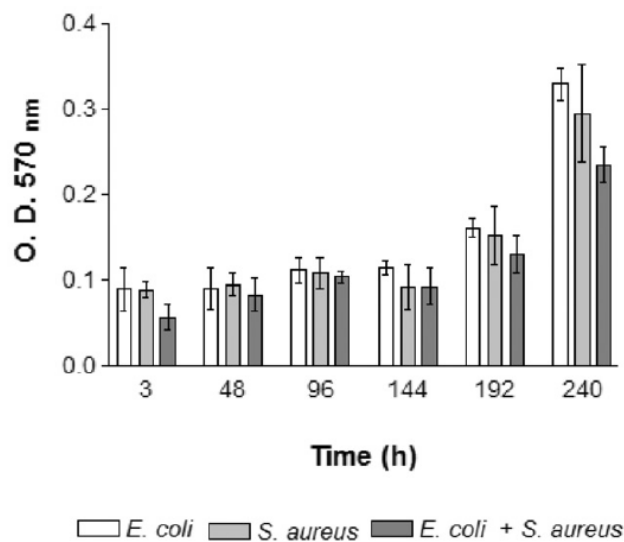


Figure 2 OD 570 values as a measure of simple and dualspecies biofilm mass of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* - The means and standard deviations for at least three replicates are illustrated.

In monospecies biofilms, the number of *S. aureus* viable cells was higher than *E. coli*; however, the difference was significant only in time 48 h, as well as dual-species culture was also higher than *E. coli* in 48 h ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3a). Fig. 3b shows that *E. coli* had a greater number of viable cells, and this difference was significant at 48, 96, 144 and 192 h ( $P < 0.05$ ).

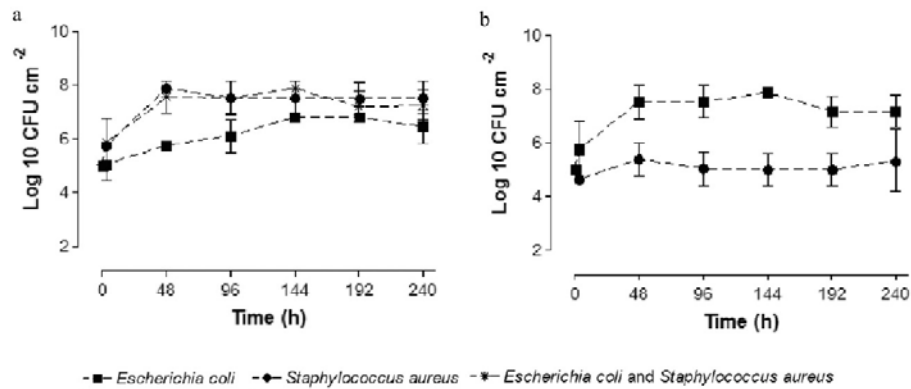


Figure 3 Biofilm cultivable cells of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in trypticase soy broth under monospecies and dual-species cultivation (a) and only dual-species (b) at 37°C over 240 h

### Sanitizing Action of EOs on the Biofilm

The EOs of citronella and lemon had similar disinfectant action on monospecies biofilm *E. coli* and *S. aureus*, and viable cells decreased significantly (Fig. 4a) after treatment. The accumulated biomass was also reduced significantly by comparing the results of the control (Fig. 4b).

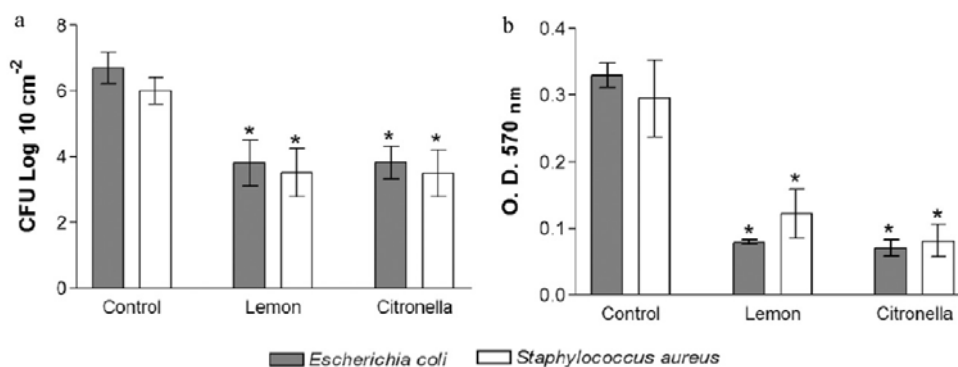


Figure 4 Effect of essential oils on cultivable cells (a) and biomass (b) of simple-species biofilms. The values are means of three separate assays, and the bars indicate standard deviation. \* $P < 0.05$  in one-way analysis of variance test.

Despite the interesting results, dual-species biofilm showed that there was greater resistance to EOs (Fig. 5). The lemon EO was more effective in reducing cultivable cells ( $P < 0.05$ ) with a reduction of 4.63 log cfu, and the treatment with citronella did not differ from control ( $P > 0.05$ ), which reduced 2.72 log cfu (Fig. 5a). Biomass again, lemon oil was more efficient; however, citronella biomass also decreased significantly ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5b). In dual-species biofilm, *E. coli* and *S. aureus* were sensitive to EOs, but the action was better for *E. coli*, reduced lemon 4.65 log cfu and citronella 4.86 log cfu/cm<sup>2</sup>. For *S. aureus*, there was reduction of only 1.52 and 1.75 log cfu/cm<sup>2</sup> through the action of EOs lemon and citronella, respectively (Fig. 6).

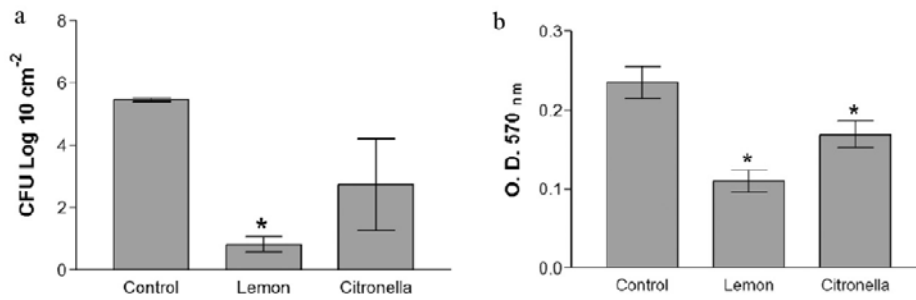


Figure 5 Effect of essential oils on cultivable cells (a) and biomass (b) of dual-species biofilm - The values are means of three separate assays, and the bars indicate standard deviation. \* $P < 0.05$  in one-way analysis of variance test.

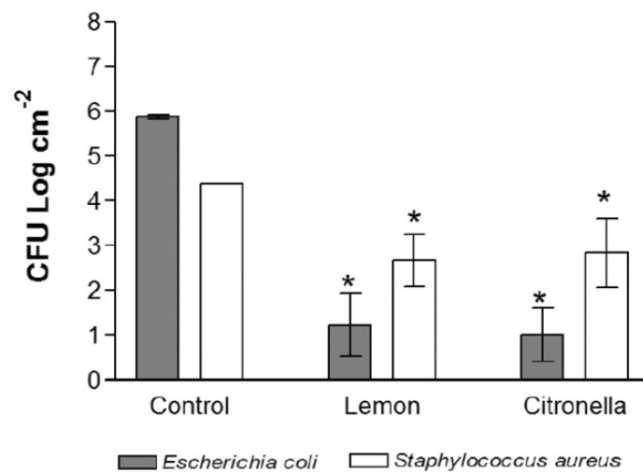


Figure 6 Effect of essential oils on cultivable cells of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in dual-species biofilm \* $P < 0.05$  in one-way analysis of variance test 240 h.

## DISCUSSION

The biofilm formation is serious risk to the food industry because the removal of irreversibly adhered cells is difficult and requires the application of strong mechanical force or chemical interruption of the microbial adhesion using surfactants, sanitizers or heat. Thus, there is a high probability that the irreversibly adhered cells will remain even in the surfaces after sanitation. This is one of the main reasons for biofilm formation on surfaces in contact with food. This risk is aggravated by *E. coli* and *S. aureus* because this study observed that these bacteria have the capacity of rapidly adhering to polypropylene, being able to reach an irreversible stage in a few hours.

One of the great biofilm formation issues in the food industry or other areas is cell detachment, which makes it a constant source of microorganism contamination in food, water or new infection processes. Thus, the evaluation of the biotransfer potential of microorganisms is interesting. In present study, this can be observed from the values found after 48 h of biofilm formation.

Significant differences are reported between different characteristics between planktonic bacteria and sessile. Ronner and Wong (1993) report up to 5 log cfu/cm<sup>2</sup> occurring genotypic and phenotypic processes that differentiate sessile from planktonic cells, indicating the formation of biofilms. According to Shank and Kolter (2009), many microorganisms can grow better in combination with other microorganisms. The present results show that the dual species association was a different situation compared with simple-species. In the present study, there was a competitive relationship in which *S. aureus* had the number of viable cells in biofilm hampered by the presence of *E. coli* ( $P < 0.05$ ).

Results similar to those found in this study were reported by Pompermayer and Gaylarde (2000) who investigated the adherence of *S. aureus*

and *E. coli*, a condition that simple species and dual-species; they concluded that there is competition between bacteria, and the growth of *E. coli* is favored in dual species cultures.

Most research into interspecies interactions within biofilms have focused on the beneficial aspects of these relationships. However, not all interactions will be advantageous for the several interacting microorganisms. Antagonistic interactions may play an important role in the development and structure of microbial communities. Competition for substrates is considered to be one of the major evolutionary driving forces in the bacterial world, and numerous experimental data obtained in the laboratory under well-controlled conditions show how different microorganisms may effectively outcompete others as a result of a better utilization of a given energy source (Christensen *et al.* 2002; Komlos *et al.* 2005; Rao *et al.* 2005). The production of antagonistic compounds also seems to be a common phenomenon for some bacteria (Tait and Sutherland 2002; Rao *et al.* 2005; Bhattarai *et al.* 2006). Boari *et al.* (2009) investigated dual-species biofilms of *S. aureus* and *Aeromonas hydrophila*, and similar behavior occurred in the present research; *S. aureus* was approximately two log cycles lower than the simple biofilm.

In the food industry, a considerable number of surfaces such as stainless steel, glass, low density polyethylene, cast iron, rubber, polycarbonate and polypropylene are susceptible to microbial adhesion. However, the surface characteristics such as electric charge, water retention capacity, free energy and topography have an important role in the accession process (Ploux *et al.* 2007). Shi and Zhu (2009) mention that the cells adhere better on hydrophilic surfaces (stainless steel, glass) than on hydrophobic surfaces (rubber and plastics). Currently, the use of polypropylene in the industry to build tanks, fittings, pipes and surfaces of food processing has grown rapidly (Lugão *et al.* 2007). According to Pompermayer and Gaylarde (2000), *E. coli* and *S. aureus* adhere to

the polypropylene surface in 8 h at 12C and 30C, but the adherence of *E. coli* was greater than *S. aureus* at both temperatures; in the present study, in 3 h, there have been similar adherence in both microorganisms, demonstrating that adherence can be very fast on inadequately sanitized surfaces of polypropylene, with conditions favorable for the formation of biofilms.

Given the rapid acceptance and training biofilms *E. coli* and *S. aureus* are necessary new strategies in sanitizing surfaces used in the food industries; in this view are the natural antimicrobial agents derived from plant secondary metabolism: EOs.

The effectiveness of disinfectants is frequently determined by the number of surface-adhered cells they are capable to reduce, obtained by standard plate count. This work showed good results using the EOs of citronella leaves and lemon peels; we demonstrated that the EOs of lemon and citronella reduce *E. coli* 4 log cfu and *S. aureus* 2.5 log cfu. The effectiveness of EOs was similar to reduction in cfu of biofilms simples species, although dual-species biofilms were more resistant to citronella oil. In dual-species, *E. coli* was more sensitive to the action of the oils, and there was less cfu reduction of *S. aureus*, a little more than 1 log cfu. Wide-spectrum antibacterial activities of EOs against gram-positive and gram negative bacteria are well documented (Chorianopoulos *et al.* 2008; Sandasi *et al.* 2008; Oliveira *et al.* 2010b; Millezi *et al.* 2012).

Research on biofilm formed by other bacteria have also shown effective results; Oliveira *et al.* (2010b) achieved a reduction of 3.28 log cfu of *Listeria monocytogenes* biofilm in the stainless steel surface disinfecting action of the EO of citronella.

The biologic activity of EOs on biofilms can be attributed to the compounds, majority of EOs. In this research, the chemical characterization of EOs is in accordance with the records of literature for the lemon oil; the compound majority limonene (Simões *et al.* 2004; Fisher and Phillips 2006) and

citronella oil are the majority citronellal, citronellol and geraniol (Oliveira *et al.* 2010b), all belonging to the group of monoterpenes.

The mechanism of action of the monoterpenes (limonene, citronellal, citronellol, geraniol) involves mainly toxic effects on the structure and function of the cell membrane. As a result of their lipophilic character, the monoterpenes will preferably dislocate from the aqueous phase toward the membrane structures (Sikkema *et al.* 1995). Accumulation of the EO constituents in the lipid double layer of the cytoplasm membrane will confer a characteristic of permeability. In bacteria, cytoplasmic membrane permeabilization is associated to dissipation of the proton motive force regarding reduction of the adenosine triphosphate pool, internal pH and electric potential, and loss of ions such as potassium and phosphate ions (Bakkali *et al.* 2008).

Another fact observed in this study was the significant reduction of biomass accumulated, suggesting that the EOs interact with the matrix of exopolysaccharide (EPS) that is disrupted (Nostro *et al.* 2007).

Thus, it was concluded from the conditions studied that EOs lemon and citronella are new alternatives to sanitize industrial polypropylene surfaces contaminated by *E. coli* and *S. aureus*. We suggest further research on search strategies using natural antimicrobials against bacterial biofilms; there are few studies on this perspective.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the first author's scholarship, the Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support, the Foundation for Science and Technology and European Community

fund European Regional Development Fund (FEDER), in the ambit of the Project PTDC/SAUESA/6460912006/FCOMP-01-0124-FEDER-007480.

## REFERENCES

- ADAMS, R.P. (ed.) 2007. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- ANDRADE, N.J. and MACÊDO, J.A.B. (eds.) 1998. *Higienização na indústria de alimentos*, Editora Varela, São Paulo, Brazil.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D. and IDAOMAR, M. 2008. Biological effects essential oils: A review. *Food Chem. Toxicol.* *46*, 446–475.
- BHATTARAI, H.D., VISWANADH, G.S., PAUDEL, B., LEE, Y.K., LEE, H.K., HONGANG, Y.K. and SHIN, H.W. 2006. The study of antagonistic interactions among pelagic bacteria: A promising way ton environmentally friendly antifouling compounds. *Hydrobiologia* *568*, 417–423.
- BOARI, C.A., ALVES, M.P., REIS, V.M., SAVIAN, T.V. and PICCOLI, R.H. 2009. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Ali.* *29*, 886–895.
- CHORIANOPOULOS, N.G., GIAOURIS, E.D., SKANDAMIS, P.N., HAROUTOUNAIAN, S.A. and NYCHAS, G.J.E.. 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: Bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid – base sanitizers. *J. Appl. Microbiol.* *104*, 1364–5072.

- CHRISTENSEN, B.B., HAAGENSEN, J.A.S., HEYDON, A. and MOLIN, S. 2002. Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2495–2502.
- COSTERTON, J.W. and STEWART, P.S. 2001. Battling biofilms. *Sci. Am.* 285, 75–81.
- COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. and CHENG, K.J. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95.
- COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. and CHENG, K.J. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 284, 1318–1322.
- FIHER, K. and PHILLIPS, C. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1232–1240.
- GANESH, C.K. and ANAND, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 9–27.
- GUIMARÃES, L.G., CARDOSO, M., DAS, G., ZACARONI, L.M., DE LIMA, R.K., PIMENTEL, F.A. and DE MORAIS, A.R. 2008. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus* [DC] Stapf). *Quím. Nova* 31, 1476–1480.
- KANIA, R.E., GERDA, M.D., LAMER, E.L., VONK, M.J., DORPMANS, E., STRUIK, J., HUY BA, P.T., HIEMSTRA, P., BLOEMBERG, G.V. and GROTE, J. 2008. Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues. *Laryngoscope* 118, 128–134.
- KOMLOS, J., CUNNINGHAM, A., CAMPER, A. and SHARP, R. 2005. Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. *Microb. Ecol.* 49, 114–125.

- LUGÃO, A.B., OTAGURO, H., PARRA, D.F., YOSHIGA, A., LIMA, L.F.C.P., ARTEL, B.W.H. and LIBERMAN, S. 2007. Review on the production process and uses of controlled rheology polypropylene- gamma radiation versus electron beam processing. *Radiat. Phys. Chem.* 76, 1688–1690.
- MILLEZI, A.F., CAIXETA, D.S., ROSSONI, D.F., CARDOSO, M.G. and PICCOLI, R.H. 2012. *In vitro* antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. *Ciênc.Tecnol. Ali.* 32, 167–172.
- MILLEZI, A.F., CARDOSO, M.G., ALVES, E. and PICCOLI, R.H. 2013. Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Braz. J. Microbiol.* (in press).
- NAVES, P., DEL PRADO, G., HUELVES, L., GRACIA, M., RUIZ, M., BLANCO, J., DAHBI, G., BLANCO, M., PONTE, C.M. and SORIANO, F. 2008. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microb. Pathog.* 45, 86–91.
- NIKOLAEV, Y.A. and PLAKUNOV, V.K. 2007. Biofilm – “city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 2, 125–138.
- NOSTRO, A., ROCCARO, A.S., BISIGNANO, G., MARINO, A., CANNALETTI, M.A., PIZZIMENTI, F.C., CIONI, P.L., PROCOPIO, F. and BLANCO, A.R. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 56, 519–523.
- OLIVEIRA, M.M.M., BRUGNERA, D.F., CARDOSO, M.G., ALVES, E. and PICCOLI, R.H. 2010a. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz. J. Microbiol.* 41, 97–106.
- OLIVEIRA, M.M.M., BRUGNERA, D.F., CARDOSO, M.G., ALVES, E. and PICCOLI, R.H. 2010b. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils

- in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. *21*, 549–553.
- PLOUX, L. BECKENDORFF S., NARDIN M., and NEUNLIST S. 2007. Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *57*, 174–181.
- POMPERMAYER, D.M. and GAYLARDE, C.C. 2000. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol.* *17*, 361–365.
- RAO, D., WEBB, J.S. and KJELLEBERG, S. 2005. Competitive interactions in mixed-species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 1729–1736.
- RONNER, A.B. and WONG, A.C.L. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Thyphimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *J. Food Prot.* *56*, 750–758.
- SANDASI, C.M., LEONARD, C.M. and VILJOE, A.M. 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* *19*, 1070–1075.
- SHANK, E.A. and KOLTER, R. 2009. New developments in microbial interspecies signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 205–214.
- SHI, X. and ZHU, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* *20*, 407–413.
- SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M. and POOLMAN, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* *59*, 201–222.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A., TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S. and GOMES, R.A.R. 2010. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*, p. 624, 4th Ed., Varela, São Paulo, Brazil.

- SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. 2004. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*, p. 1102, 5th Ed., Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.
- STEPANOVIC´, S., VUKOVIC´, D., DAVIC´, I., SAVIC´, B. and S´ VABIC´ -VLAHOVIC´, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microb. Meth.* 40, 175–179.
- TAIT, K. and SUTHERLAND, I.W. 2002. Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 93, 345–352.
- VERRAN, J. and JONES, M. 2000. *Industrial Biofouling*, John Wiley and Sons Ltd., New York, NY.
- WIRTANEN, G., HUSMARK, U. and MATTILA-SANDHOLM, T. 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J. Food Prot.* 59, 727–733.

**Artigo 3 Antibiofim and antibacterial effect of essential oils and their major compounds on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***

**Biofouling – Artigo submetido em 28 de outubro de 2012**

**Anti-biofilm and antibacterial effect of essential oils and their major  
compounds on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus***

Alessandra Farias Millezi <sup>a, c</sup>; Roberta Hilsdorf Piccoli <sup>b</sup>; José Maria Oliveira <sup>c</sup>;  
Maria Olívia Pereira<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil

<sup>c</sup> IBB – Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710–057 Braga, Portugal

\* Corres Lavras, correspondence author: Roberta Hilsdorf Piccoli, Caixa Postal 3037, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. CEP: 37200-000  
e-mail: rhpiccoli@dca.ufla.br

### Abstract

Essential oils are plant secondary metabolites commonly used in traditional medicine to treat infectious diseases. Along with their compounds, oils can contribute to development of new antimicrobial/anti-biofilm products and drugs. Our study evaluated antibacterial activity of essential oils (EOs) and their major compounds on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* plankton cells and anti-biofilm activity. The effect of EOs and their major compounds on bio-film and plankton cells was assessed by quantifying the number of viable cells (CFU). Biomass quantification (absorbance = OD<sub>570nm</sub>) was also performed to evaluate anti-biofilm activity. Chromatographic analyses were conducted to characterize EOs. Plankton cells were more susceptible to the action of agents. *Escherichia coli* was reduced by 100% with cinnamon and palmarosa oil. The treatment showed an interesting anti-biofilm activity, whereas green tea essential oil and its major compound, terpinen-4-ol, yielded less effective results. Reduction of viable cells in biofilm biomass was significant. Although our research is one of the first experiments in anti-biofilm activity of EOs and their compounds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, pharmacological data confirm that the materials used in the trial do not pose health risk. Thus, EOs and their compounds can be safely used in research to identify new antibacterial and anti-biofilm products against pathogenic bacteria.

**Key words:** natural antimicrobial, bacterial biofilms, foodborne pathogens

## 1. Introduction

Biofilms comprise highly structured matrix-enclosed communities (Costerton, 1999) and represents a mode of growth that allows bacteria to both survive in hostile environments and colonize new niches through dispersal mechanisms (Hall-Stoodley and Stoodley, 2005; Purevdorj-Gage et al., 2005; Mai-Prochnow et al., 2008). Furthermore, biofilm bacteria show coordinated behavior by building complex three-dimensional structures and functionally heterogeneous bacterial communities (Stoodley et al., 2002; Hall-Stoodley et al., 2004).

Biofilm cells express genes in patterns (Sauer et al, 2002) differently from their plankton counterparts. Direct observation shows that biofilms are ubiquitous in both natural and pathogenic ecosystems (Costerton 1978, Costerton, 2001); however, plankton cultures in the systems should be studied as well. One of the advantages of plankton cells forming biofilms on the surface is protection against action of antibiotics and antimicrobial agents (Gilbert et al., 2002; Hall-Stoodley et al., 2009 Mah & O'Toole, 2001).

Over the last two decades several publications have considered the genus *Staphylococcus* capable of forming biofilm bacteria, causing infections defined as "chronic infections associated with biopolymers" (Götz, 2002). After biomaterial implantation, such staphylococcal infections may occur early or late

(Jayakrishnan & James, 2003; Izanetal., 2008). Due to its ability to adhere to inert surfaces, *S.aureus* has become the major agent of hospital-acquired infections associated with biopolymers worldwide (James and Jayakrishnan, 2003; Izanetal., 2008).

*Escherichia coli* can behave as intestinal commensal, diarrheagenic and extra intestinal pathogenic agent. It is responsible for most community and hospital-acquired Gram-negative bacterial infections. *E.coli* is found in the gut flora, also colonizing the genital mucosa. Thus, bacteria may enter the urinary system and adhere to mucosal surfaces and implant devices (Esmerino et al, 2003; Watanabe et al., 2001). Adherence and formation of biofilms cause infections that contribute to significant morbidity rate, although they may be short term cases (Esmerino et al., 2003).

Thus, alternative strategies or effective agents to act against biofilm-producing microorganisms are of great interest. Natural drugs could be an interesting approach to limit emergence and spread of such organisms, which are currently difficult to fight. Recently, there has been considerable interest in the study of plant materials as sources of new compounds (Knowles, et al., 2005; Sandasi, et al., 2008) for processing therapeutic agents. One approach could be the use of essential oils, which have been found to be potential and safe antibacterial agents (Nostro et al., 2007).

The functional use of natural essential oils as antibacterial agents has been increasing in medicine and dentistry. Mouthwashes containing essential oils can kill oral microorganisms by inhibiting their enzyme activity and breaking down their cell walls (Quhayoun, 2006). Essential oils also inhibit coaggregation between early and late colonizers, e.g. Gram-negative anaerobic periodontopathogens (Quhayoun, 2006). In addition, essential oils inhibit formation of bacterial biofilms on surfaces such as polystyrene (Gursoy et al., 2009).

In our study, three essential oils were selected based on their use as antimicrobial agents in Brazilian traditional medicine. We also used their respective major compounds to test and compare effects on plankton bacteria and biofilms. Thus, our study evaluated anti-biofilm and antibacterial activity of essential oils and their major compounds in plankton cells of *E.coli* and *S.aureus*.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Essential oils and major compounds**

Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Cymbopogon martini* (palmarosa) and *Melaleuca alternifolia* (green tea) extracted from plant leaves by hydro-distillation were purchased from Ferquima Indústria e Comércio

Ltda. (Vargem Grande, São Paulo, Brazil), According to the company, the major compound of cinnamon is eugenol (86%); geraniol (86%) in palmarosa oil; and terpine-4-ol (48%) in green tea oil. The isolated major compounds were purchased from Sigma Aldrich.

## **2.2. Microorganism and inoculum standardization**

We used *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 24922. Standardization of number of cells was determined by calibration curve. Cultures were grown on Trypticase Soy Agar (TSA, Merck, Portugal) added to Petri dishes and incubated at 37 °C for 24 hours. Some colonies formed on TSA surface were removed and transferred to Erlenmeyer flasks containing 50 mL of Trypticase Soy Broth (TSB, Merck, Portugal), which were incubated at 37°C until reaching the number of cells necessary for the experiment, approximately  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

## **2.3. Effect of essential oils on growth of plankton cells**

The solution was formed in accordance with the model proposed by Oliveira et al. (2010) with some modification, as ethanol was replaced by dimethylsulfoxide (DMSO). We used concentrations 0.48, 0.96 and 1.92% of essential oils, while concentration of major compounds corresponded to oil

concentration. The solution contained DMSO, 0.85% saline water, 0.5% Tween 80, and TSB. Aliquots of 100  $\mu\text{L}$  were dispensed into 96-well micro-plates (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) with 100  $\mu\text{L}$  TSB containing  $10^8$  CFU per mL. Wells containing only TSB served as control. The plates were incubated in aerobic conditions for 24 h at 37°C in orbital shaker at 120 rpm. After incubation, plankton cells were collected for quantification of viable cells ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ).

#### **2.4. Effect of essential oils and compounds on bacterial biofilms**

Biofilms were developed on 96-well microtiter plates (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) in solutions containing essential oils and their major compounds. Bacterial cell suspensions (100  $\mu\text{L}$  of  $1 \times 10^8$  cells  $\text{mL}^{-1}$  in TSB), essential oils and compounds (100  $\mu\text{L}$  of the concentrations previously described) were pipetted into each well and incubated for 24 h at 37°C in orbital shaker at 120 rpm.

#### **2.5. Quantification of cultivable cells**

Plankton cells were quantified by plating on TSA medium. To quantify biofilm cells, the wells were washed in water to remove plankton bacteria. Viable biofilm cells were removed by sonication and serially diluted. Samples were then plated on TSA medium, and plates were incubated at 37°C in aerobic

incubator for 18 h prior to enumeration. The number of cultivable bacterial cells was determined and expressed as Log CFU per mL<sup>-1</sup> (plankton) and Log CFU per cm<sup>2</sup> (sessile). Assays were performed on three separate occasions.

### **2.6 Biomass quantification by Crystal Violet staining**

Biomasses of single and mixed biofilms were quantified by the crystal violet (CV) staining method by Stepanovic' et al. (2000). For fixing, we added 200 µL of 99% methanol (Vaz Pereira, Portugal) to each well containing adhered cells or biofilms treated with essential oils, as previously described. After 15 minutes the methanol was removed, and the plates were allowed to dry at room temperature. Then we added 200 µL of crystal violet stain (CV; 1% v/v) (Merck, Portugal) to all wells. After 5 minutes, CV excess was removed and plates were gently washed in water. Finally, 230 µL of acetic acid (33% v/v) (Pronalab, Portugal) were added to the wells to dissolve CV stain, and the absorbance was measured at 570 nm. All assays were performed in triplicate on three separate occasions.

### **2.7. Statistical analysis**

Data were analyzed with GraphPad Prism®. One-way ANOVA tests were performed and p<0.05 was considered significant.

### **3. Results**

#### **3.1. Antimicrobial activity against plankton cells**

Essential oils and their major compounds showed significant antimicrobial potential ( $P < 0.05$ ) against plankton bacteria of *E. coli* and *S. aureus* (Fig. 1). *Escherichia coli* was more susceptible to the action of cinnamon and palmarosa oils at concentration 0.96%, with 100% reduction of cell growth. The lowest concentrations were also considered effective, as reductions were greater than 5 log CFU. Eugenol and geraniol reduced more than 90% plankton cells of *E. coli* (Fig. 2). Essential oil of green tea was the least effective, as it reduced 1.95 and 2.03 log CFU at concentrations 0.12% and 0.48% respectively. However, reduction was over 5 log CFU at concentration 0.96% (Figure 1) while its major compound, geraniol, reduced more than 7 log CFU (Figure 2).

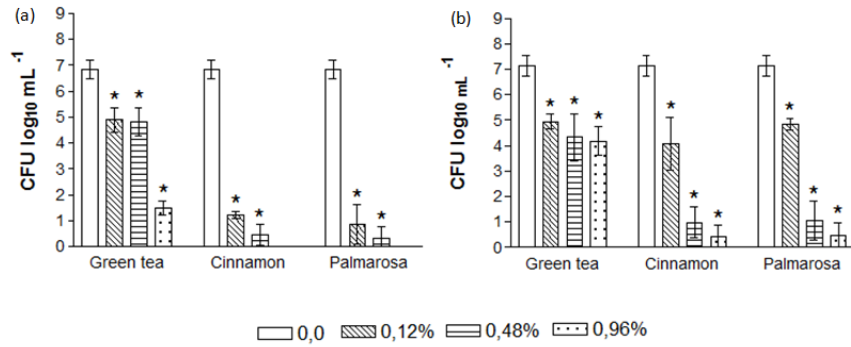


Figure 1 Inhibition *E. coli* (a) and *S. aureus* (b) viable planktonic cells for different concentrations of essential oils.  $*P < 0.05$  in one-way analysis of variance test.

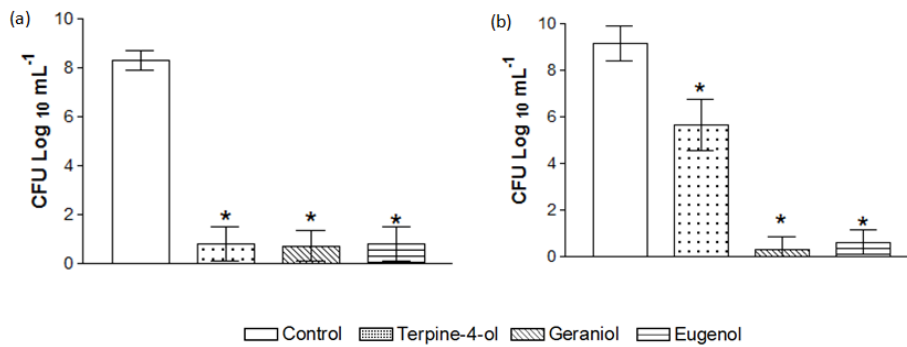


Figure 2 Inhibition *E. coli* (a) and *S. aureus* (b) viable planktonic cells for compounds majority of essential oils.  $*P < 0.05$  in one-way analysis of variance test.

Reduction of plankton cells of *S. aureus* was also significant ( $p < 0.05$ ) (Figures 1 and 2). Viable cells in biofilms were more resistant to essential oil action than plankton bacteria (Fig. 3). Green tea essential oil showed low anti-

biofilm potential while its major compound terpinene-4-ol had no significant anti-biofilm activity against *E. coli* ( $P > 0.05$ ). The maximum reduction against *E. coli* was 1.66 log CFU at concentration 0.96%. Palmarosa oil had the greatest anti-biofilm potential at concentration 0.96%, reducing 3.04 log CFU. However, as well as geraniol, anti-biofilm potential was less than 50% at lower concentrations. Cinnamon essential oil was the most effective against viable biofilm cells of *E. coli*, with all concentrations showing reduction over 3 log CFU. At concentration 0.96%, reduction was over 75%. Eugenol, however, did not show the same efficiency, decreasing only 1.88 log CFU (Fig. 4).

The action of green tea, palmarosa and cinnamon essential oils was significant ( $P < 0.05$ ) in biomass reduction of *E. coli* biofilm (Fig. 3). The major compounds were also effective (Fig. 4). Formation of *E. coli* biomass was inhibited by more than 93% in treatments with oils and their major compounds.

Reductions of viable biofilm cells of *S. aureus* were lower than in *E. coli*. At concentration 0.96% green tea essential oil showed significant decrease ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3), although only reaching 1.76 log CFU. Terpinen-4-ol was not effective to prevent formation of *S. aureus* biomass ( $P > 0.05$ ). Palmarosa essential oil was significantly effective at concentrations 0.48% and 0.96%, reducing 3.12 and 4.17 log CFU respectively, while geraniol reduced only 25%. As observed in *E. coli*, cinnamon essential oil also showed greater anti-biofilm capacity against *S. aureus*. Cinnamon essential oil at concentration 0.96%

reduced 66% viable biofilm cells of *S. aureus*, equivalent to 4.19 log CFU; however, the same efficiency was not observed for eugenol, which decreased 29.22% cells, equivalent to 2 log CFU.

The effect of essential oils and compounds in *S. aureus* biomass was good except for green tea oil at concentration 0.12%, which did not prevent biomass formation ( $P > 0.05$ ). Palmarosa and cinnamon essential oils as well as their major compounds showed greater ability to inhibit biomass formation over 62%. Palmarosa oil at concentration 0.96% showed the greatest reduction (86.04%) (Fig. 3).

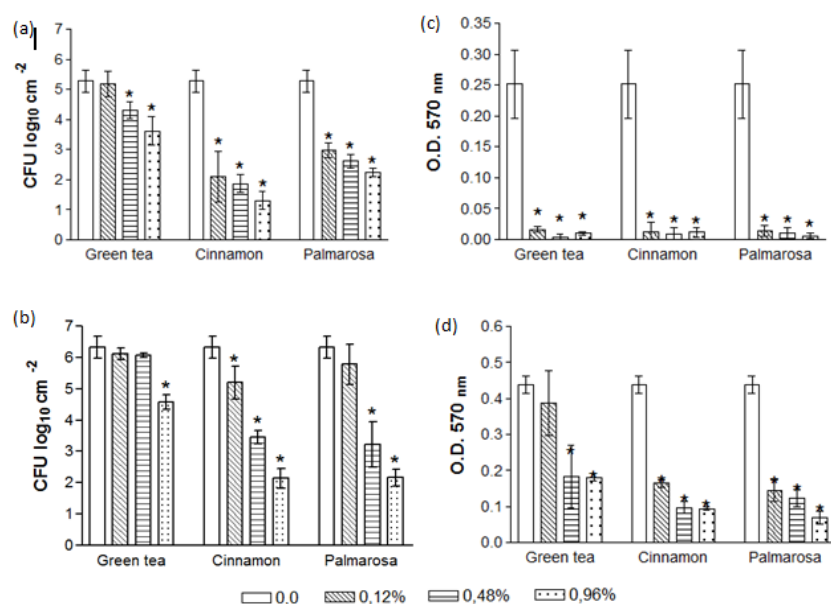


Figure 3 Activity antibiofilm of essential oils on *E. coli* (a) and *S. aureus* (b) cells cultivated in biofilms and *E. coli* (c) and *S. aureus* (d) biomass. \* $P < 0.05$  in one-way analysis of variance test.

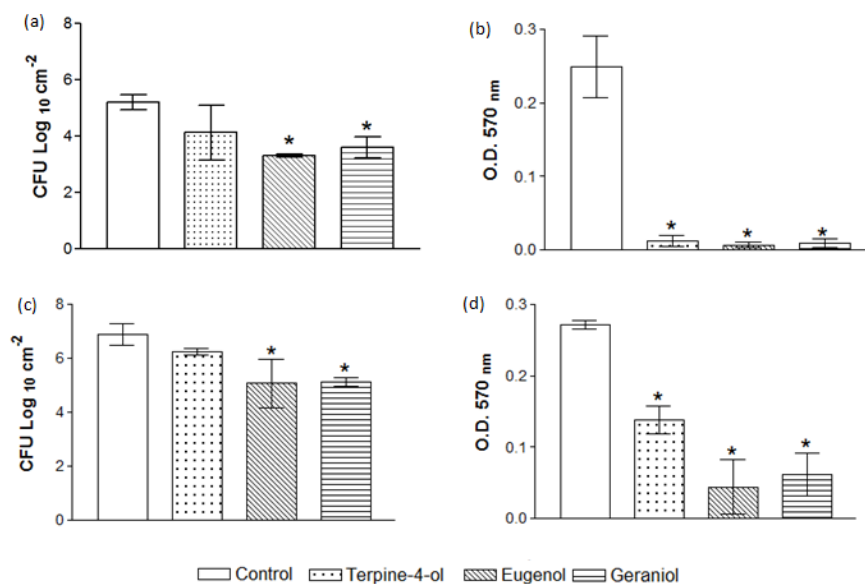


Figure 4 Activity antibiofilme different major compounds of essential oils on *E. coli* (a) and *S. aureus* (c) cells cultivated in simple biofilms and *E. coli* (b) and *S. aureus* (d) biomass. \**P* < 0.05 in one-way analysis of variance test.

## Discussion

Essential oils and their compounds are known to be active against a wide variety of microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria (Deans and Ritche, 1987; Duarte et al., 2007; Gursoy et al., 2009; Helander et al., 1998) in both plankton form (Millezi et al., 2012) and biofilm (Millezi et al., 2013; Oliveira et al., 2010). Bacteria in biofilm mode of growth have been much more resistant to antibiotics than their plankton counterparts (Lewis, 2001,

Sandasi et al., 2008). In our study, such phenomenon also occurred in the action of essential oils and their compounds. This result confirmed the greater resistance of viable bacterial cells in biofilm rather than in plankton mode for both *E.coli* and *S.aureus*.

According to Stoodley et al., (2002), plankton phenotype differs profoundly from biofilm phenotype, which involves the expression of a large number of genes that allow sessile bacteria to better resist to environmental stresses and adverse conditions, as well as to the presence of antibiotics and antimicrobial agents. In a recent study, mature biofilms of *P. aeruginosa* have shown a protein profile radically different from plankton bacteria grown in chemostats (Sauer et al., 2002). As much as 50% of detectable proteome (over 800 proteins) have shown a six-fold or greater difference in expression. Of these proteins, more than 300 were detected in mature biofilm samples undetectable in plankton bacteria. The identified proteins fall into five major classes: metabolism, phospholipids and LPS-biosynthesis, membrane transport and secretion, as well as adaptation and protective mechanisms (Sauer et al., 2002).

Several studies have addressed the use of natural compounds as antimicrobial agents (Knowles, et al., 2005; Nostro et al., 2007, Sandasi et al., 2008; Trentin et al. 2011). However, little has been reported on the effect of cinnamon, palmarosa and green tea essential oils and their respective major compounds eugenol, geraniol and terpinene-4-ol against pathogenic bacteria.

According to our knowledge, this is the first study investigating anti-biofilm action of essential oils of cinnamon and palmarosa and their major compounds against *S.aureus* and *E.coli*.

Our study showed an interesting anti-biofilm action of essential oils and their major compounds against *S.aureus* and *E.coli*. Most treatments produced good action on viable biofilm cells and biomass. Essential oils had a better performance than their individual compounds. According to Sandasi et al. (2008), some compounds of essential oils ( $\alpha$ -pinene, linalool, 1.8-cineole, geranyl acetate) were unable to inhibit biofilm growth in *Listeria monocytogenes*. The authors suggest that resistance to inhibition could be the fact that compounds used individually do not have the same activity as oils. Studies have shown that antimicrobial effect of essential oils is due to interaction between oils and their compounds instead of depending on individual components (Delaquis & Stamic, 2004; Mourey & Canillac, 2002; Oliveira et al., 2010). Thus, our results were better against *E. coli* than against *S. aureus*, corroborating the results of experiments carried out by Budzynski et al. (2011), in which Gram-negative bacteria were very susceptible to damage caused by essential oils of *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia* and *Melissa officinalis* and some of their major compounds ( $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, linalool, linalyl acetate). Strong and fast anti-biofilm activity of TTO was noticed against *E. coli*, which was eradicated within 1 hour exposure to

concentration 0.78% (Budzynski et al; 2011). However, only plankton cells were completely eradicated in our study. Differences in the reported data could be due to many factors including differences in the strains, concentration and chemical composition of essential oils, time of exposure to oils, growth stage of biofilm, and nature of surface to which organisms adhere (Burt & Reineders, 2004; Gobbo Netto & Lopes, 2007; Leonard et al., 2010).

The findings of this study highlight the promising role of compounds derived from plant secondary metabolism, especially essential oils, as antibacterial and anti-biofilm agents. Literature data on the pharmacological compounds used in this experiment suggest they pose no risk to human or animal health (Chami et al, 2005; Stamatii et al, 1999). Therefore, it may be worth further investigation.

### **Acknowledgments**

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the first author's scholarship, the Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for the financial support, the Foundation for Science and Technology and European Community fund European Regional Development Fund (FEDER), in the ambit of the Project PTDC/SAUESA/6460912006/FCOMP-01-0124-FEDER-007480.

## References

- Burt, S.A., Reinders, R.D. 2004. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*. 36, 162-167.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*. 238: 86–95.
- Budzyńska, A.; Więckowska-Szakiel, M.; Sadowska, K.; Kalemba, B.D.; B. Ró-  
Alska. 2011. Antibiofilm Activity of Selected Plant Essential Oils and their  
Major Components. *Polish Journal of Microbiology*. 60: 35-41.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilms: a  
common cause of persistent infections. *Science*. 284, 1318–22.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. 2001. Battling biofilms. *Scientific American*. 285,  
75–81.
- Chami, N. et al. 2005. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in  
vitro and in vivo. *Oral Microbiology and Immunology*. 20, 106–111.
- Deans, S.G., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils.  
*International Journal of Food Microbiology*. 5, 165-180.
- Duarte, M.C.T. et al. 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal  
plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 197-201.

Esmerino, L. A.; Gonçalves, G. L.; Schelesky, M. E. 2003. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de infecções urinárias comunitárias. *Ciências Biológicas e Saúde*. 9, 31-39.

Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J. 2002. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *Journal Applied of Microbiology*. 92, 98–110.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. *Química Nova* 30, 374-381.

Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*. 43, 1367-1378.

Gursoy, U.K. et al. 2009. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*. 15, 164–167.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiology*. 11, 1034–1043.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2, 95-108.

Helander, I.M. et al. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46, 3590-3595.

Izano, E.A. et al. 2008. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and

*Staphylococcus epidermidis* biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 74, 470-476.

Knowles, J.R. et al. 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Applied and Environmental Microbiology. 71, 797–803.

James, N.R., Jayakrishnan, A. 2003. Surface thiocyanation of plasticized poly (vinyl chloride) and its effect on bacterial adhesion. Biomaterials. 24, 2205-2212.

Leonard C.M. et al. 2010. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. South African Journal of Botany, 76, 676-680.

Lewis, K. 2001. The riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy 45, 999–1007.

Mai-Prochnow, A., et al. 2008. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria. Journal Bacteriology. 190, 5493–5501.

Mah, T. F. & O'Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiology. 9, 34–39.

- Naves, P. et al. 2008. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis*. 45, 86-91.
- Nostro, A. et al. 2007. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56 519-523.
- Oliveira, M. M. M. et al. 2010. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*. 21, 549–553.
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J.; Stoodley, P. 2005. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology*. 145, 1569–1576.
- Quhayoun, J.P. 2003. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. 30, 10–12.
- Sandasi, M., Leonard, C. M., Viljoen, A. M. 2008. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19, 1070-1075.
- Sauer, K. et al. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal Bacteriology*. 184, 1140–1154.
- Stammati, A. et al. 1999. Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chemistry and Toxicology*. 37, 813–823.

Stepanovic, S. et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40, 175–179.

Stoodley, P. et al. 2002. Biofilm mechanics and shear-induced deformation and detachment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29, 361–368.

Trentin, D. Da S. et al. 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*. 137, 327–335.

Watanabase, D.S.A., Michelin, L. A., Montelli, A. C. 1991. Infecção urinária por *Escherichia coli* – correlação de características clínicas, patogênicas e sorogrupos. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. 27, 111-117.