

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS FRENTE A PATÓGENOS
SÉSSEIS E PLANCTÔNICOS DE ORIGEM
ALIMENTAR**

CAROLINA VALERIANO

2010

CAROLINA VALERIANO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A
PATÓGENOS SÉSSEIS E PLANCTÔNICOS DE ORIGEM ALIMENTAR**

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

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Valeriano, Carolina.

Ação antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos
sésseis e planctônicos de origem alimentar / Carolina Valeriano. –
Lavras : UFLA, 2010.

95 p. : il.

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

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Biofilmes. 2. Sanitizantes. 3. Microscopia eletrônica de
varredura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

CAROLINA VALERIANO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A
PATÓGENOS SÉSSEIS E PLANCTÔNICOS DE ORIGEM ALIMENTAR**

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

APROVADA em 26 de janeiro de 2010.

Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista

UFLA

Prof. Dr. Geraldo Marcio da Costa

UFLA

Profa. Dra. Sandra Maria O. M. Veiga

UNIFAL

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Irmã Benigna, por iluminarem os meus caminhos.

À minha mãe, Beatriz, pelo amor, apoio, ajuda, educação suporte e exemplo.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo amor, carinho, companheirismo e amizade.

Aos meus avós, Teresinha e Morera e ao meu tio Reginaldo, por torcerem por mim.

Ao meu pai, pelo carinho e por torcer por mim.

Ao meu namorado, Carlos Henrique, pela compreensão e apoio.

A minha cunhada Aline, pela amizade, ajuda, companheirismo e por torcer por mim.

À minha orientadora, Roberta Hilsdorf Piccoli, pela orientação e ensinamentos, pela paciência, por estar sempre disposta a ajudar, pela compreensão e, acima de tudo, pelo carinho e amizade.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela disponibilidade, atenção e ensinamentos e pela colaboração na extração dos óleos essenciais.

Ao professor Eduardo Alves, pela atenção e sugestões e, principalmente, pela disponibilidade e colaboração na realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pelas oportunidades, cooperação e contribuição.

À Universidade Federal de Lavras.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

A Samísia Machado e José Eraldo, do laboratório METABIO da Universidade Federal do Sergipe, pela colaboração na quantificação e na caracterização dos óleos essenciais.

Aos alunos do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química (DQI) da UFLA, Milene, Luiz Gustavo, Paula, Rafaela, Sara e Vanessa, pela ajuda na extração dos óleos essenciais

Ao Pefa, pelo auxílio com as análises estatísticas.

A Heloisa, Douglas, Claudia e Luciane, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, pela ajuda e boa vontade em ensinar.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio e amizade.

A Ivani, Elaine e Magda, pela disposição em ajudar sempre e pela amizade.

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para que eu alcançasse este sonho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO GERAL.....	iv
GENERAL ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 Ação antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos sésseis e planctônicos de origem alimentar.....	
1 Introdução geral.....	1
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Biofilmes.....	4
2.2 Óleos essenciais	7
3 Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 2: Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar.....	16
1 Resumo.....	17
2 Abstract.....	18
3 Introdução.....	19
4 Material e métodos.....	21
4.1 Material vegetal.....	21
4.1.1 Extração dos óleos essenciais e determinação do rendimento.....	21
4.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais....	21
4. 2 Teste de atividade antibacteriana.....	22
4.2.1 Microrganismos.....	22
4.2.2 Padronização, estocagem e preparo do inóculo.....	23
4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana.....	24
4.3 Análise dos dados.....	24
5 Resultados e discussão.....	26

6 Conclusão.....	36
7 Referências bibliográficas.....	37
CAPÍTULO 3: Formação de biofilme por <i>Escherichia coli</i> em aço inoxidável e ação sanificante de óleos essenciais.....	
	43
1 Resumo.....	44
2 Abstract.....	45
3 Introdução.....	46
4 Material e métodos.....	48
4.1 Microrganismos utilizados, padronização, preparação e estocagem do inoculo.....	48
4.2 Modelo experimental de formação do biofilme.....	48
4.3 Preparação dos cupons e suporte de aço inoxidável.....	49
4.4 Formação do biofilme.....	49
4.5 Materiais vegetais.....	50
4.5.1 Extração dos óleos essenciais.....	50
4.5.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	50
4.5.3 Determinação da atividade antimicrobiana.....	51
4.5.4 Tratamento dos cupons com óleos essenciais.....	52
4.6 Enumeração das células do biofilme.....	53
4.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	53
4.8 Análise estatística.....	54
5 Resultados.....	55
5.1 Composição química dos óleos essenciais.....	55
5.2 Formação do biofilme.....	55
5.3 Atividade antibacteriano dos óleos essenciais.....	56
5. 4 Microscopia eletrônica de varredura.....	57
6 Discussão.....	61
7 Conclusão.....	65

8 Referências bibliográficas.....	66
CAPÍTULO 4: Formação de biofilme por <i>Salmonella enteritidis</i> em aço inoxidável e ação sanificante de óleos essenciais.....	70
1 Resumo.....	71
2 Abstract.....	72
3 Introdução.....	73
4 Material e métodos.....	75
4.1 Microrganismos usados, padronização, preparação e estocagem do inóculo.....	75
4.2 Modelo experimental de formação do biofilme.....	75
4.3 Preparo dos cupons e suporte de aço inoxidável.....	76
4.4 Formação do biofilme.....	76
4.5 Materiais vegetais.....	77
4.6 Extração dos óleos essenciais.....	77
4.7 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	77
4.8 Determinação da atividade antimicrobiana.....	78
4.9 Tratamento dos cupons com óleos essenciais.....	79
4.10 Enumeração das células do biofilme.....	79
4.11 Microscopia eletrônica de varredura.....	80
4.12 Análise estatística.....	80
5 Resultados e discussão.....	81
6 Conclusão.....	90
7 Referências bibliográficas.....	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2		Página
TABELA 1	Atividade bactericida (UA/mL $\pm$ EP) dos diferentes óleos essenciais para <i>Salmonella</i> sp.; <i>E. coli</i> ; <i>Listeria</i> sp. e <i>Enterobacter</i> sp.....	28
CAPÍTULO 3		Página
TABELA 1	Percentual da composição dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e de <i>Mentha piperita</i>	58
TABELA 2	Número de células de <i>Escherichia coli</i> aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC cm ⁻² , às 240 horas de formação de biofilme, após tratamento com óleo essencial.....	59
CAPÍTULO 4		Página
TABELA 1	Número de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC cm ⁻² , após 240 horas de formação de biofilme, após tratamento com óleo essencial.....	85

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 3	Página
FIGURA 1	Quantificação do crescimento de <i>Escherichia coli</i> durante a formação de biofilme sobre aço inoxidável AISI 304 (#4), com incubação a 35°C em meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato.....
	56
FIGURA 2	Eletromicrografia de varredura do biofilme formado <i>E. coli</i> em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 240 horas de contato a 35°C. submetidas a soluções a base de óleo essencial. (A) controle, sem tratamento; (B) <i>C. citratus</i> 10 minutos de tempo de contato; (c) <i>C. citratus</i> 20 minutos de tempo de contato; (D) <i>C. citratus</i> 40 minutos de tempo de contato; (E) controle, sem tratamento; (F) <i>M. piperita</i> 10 minutos de tempo de contato; (G) <i>M. piperita</i> 20 minutos de tempo de contato; (H) <i>M. piperita</i> 40 minutos de tempo de contato.....
	60
CAPÍTULO 4	Página
FIGURA 1	Quantificação do crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis durante a formação de biofilme sobre aço inoxidável AISI 304 (#4), com incubação a 37°C em meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato 35°C em meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrat.....
	83

FIGURA 2	Eletromicrografia de varredura de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304(# 4) após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato sem solução de óleo essencial.....	87
FIGURA 3	Eletromicrografia de varredura de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304(# 4) após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas a soluções de óleo essencial de <i>M. piperita</i> (A) e (B) 10 minutos de tempo de contato; (C) 20 minutos de tempo de contato (D) 40 minutos de contato.....	88
FIGURA 4	Eletromicrografia de varredura de células de <i>Salmonella</i> Enteritidis aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304(# 4) após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas a soluções de óleo essencial de <i>C. citratus</i> . (A) e (B) 10 minutos de tempo de contato; (C) 20 minutos de tempo de contato (D) 40 minutos de contato.....	89

RESUMO GERAL

VALERIANO, Carolina. **Ação antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos sésseis e planctônicos de origem alimentar.** 2010. 95p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O desenvolvimento de biofilmes em ambientes de processamento de alimentos pode ser uma fonte contínua de contaminação. O aumento da resistência das células no biofilme a agentes antibacterianos e sanitizantes torna necessário o desenvolvimento de novas alternativas para seu controle. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a sensibilidade de células planctônicas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazaki* frente à ação de óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana*. Objetivou-se também avaliar a sensibilidade de células sésseis de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Salmonella enterica* Enteritidis frente a soluções à base de óleo essencial de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus*. A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação, utilizando-se aparelho de cleveenger modificado. O efeito das diferentes concentrações dos óleos essenciais foi avaliado pela técnica de difusão em ágar. A formação do biofilme foi realizada sobre a superfície de cupons de aço inoxidável, utilizando como substrato caldo triptona de soja. O número de células aderidas foi determinado após 48, 96, 144, 192 e 240 horas. As soluções à base de óleo essencial foram testadas após as 240 horas de formação do biofilme, em três tempos de contato (10, 20 e 40 minutos). As quantidades de óleos essenciais utilizadas nas soluções foram baseadas nas CMI's. Cupons de aço inoxidável submetidos às soluções a base de óleos essenciais foram analisados por MEV, para visualização da ação dos óleos essenciais nas células. Observou-se que o efeito bactericida dos óleos essenciais apresentou efetividade variada para as bactérias testadas. Pelo número de células aderidas, observou-se que tanto *Escherichia coli* quanto *Salmonella* Enteritidis aderiram rapidamente à superfície, formando biofilme maduro após 240 horas. As soluções à base de óleo essencial mostraram-se efetivas na redução do número de células sésseis, principalmente após 20 e 40 minutos de contato. Ambas as soluções foram capazes de reduzir 100% do número de células do biofilme após 20 minutos de contato.

* Comitê Orientador: Roberta Hilsdorf Picolli – UFLA (Orientadora), Maria das Graças Cardoso – UFLA.

Pela MEV, observaram-se alterações estruturais nas células bacterianas, provavelmente causadas pela atuação dos óleos essenciais. Os óleos essenciais avaliados se mostraram efetivos frente as bactérias testadas, podendo ser considerados novas alternativas na sanitização de superfícies de aço inoxidável.

Palavras-chave: *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella* entérica Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazaki*.

GENERAL ABSTRACT

VALERIANO, Carolina. **Ação antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos sésseis e planctônicos de origem alimentar.** 2010. 95p. Thesis. (Ph.D. in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Biofilm formation in food processing environments can be a continuing source of contamination. Increased resistance of biofilm cells to antibacterial and sanitizers agents requires the development of new alternatives to control them. This work was executed with the aim of (1) evaluating the planktonic cells sensitivity of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazaki* against the antibacterial action of *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum*, and *Origanum majorana*; and (2) studying the sessile cells sensitivity of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Enteritidis against solutions based on essential oil of *M. piperita* and *C. citratus*. The essential oil extraction was performed by hydrodistillation using the modified Clevenger apparatus. The effect of the different essential oil concentrations was evaluated by the agar diffusion technique. The biofilm formation was performed on the surface of stainless steel chips by using tryptone soy broth as substrate. The adhered cells number was evaluated after 48, 96, 144, 192 and 240 hours. Solutions based on essential oil were tested after 240 hours of biofilm formation at three contact durations (10, 20 and 40 minutes). The amount of essential oil used in the solutions was based on MICs. Stainless steel chips submitted to the solutions based on essential oil were analyzed by SEM to visualize the action of the essential oil in the cells. The bactericidal effect of essential oil presented varying effectiveness for all the bacteria tested. According to the adhered cells number it was observed that *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Enteritidis adhered quickly to the surface forming ripe biofilm after 240 hours. The solutions based on essential oil were effective in the reduction of the sessile cells number, mainly after contact of 20 and 40 minutes. Both solutions were able to reduce 100% of the biofilm cells number after contact of 20 minutes.

* Guidance Committee: Roberta Hilsdorf Piccoli– UFLA (Advisor), Maria das Graças Cardoso – UFLA.

In the SEM was possible to observe the structural alterations in the bacteria cells, probably caused by the performance of the essential oil. The essential oil evaluated were effective against the bacteria tested. These findings can be used as new alternatives in the sanitization of stainless steel surfaces.

Key-word: *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter sakazaki*.

CAPÍTULO 1

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A PATÓGENOS SÉSSEIS E PLANCTÔNICOS DE ORIGEM ALIMENTAR

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os biofilmes são constituídos por bactérias que aderem a superfícies e que são envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, ou seja, depósitos nos quais os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, conhecida por exopolissacarídeos (EPS) (Nikolaev & Plakunov, 2007).

Os biofilmes têm um impacto negativo em varias atividades. Estragos em equipamentos por biocorrosão, entupimento de membranas e filtros e perdas energéticas relacionadas com o aumento do atrito são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos e representam perdas significativas para a indústria em âmbito global (Walker et al., 1998).

Quando microrganismos patogênicos e deterioradores participam do processo de formação de biofilme, podem contaminar produtos alimentícios, causando danos à saúde do consumidor e provocar grandes prejuízos econômicos (Characklis, 1990).

Tais problemas são agravados pela resistência demonstrada por biofilmes a antibióticos e biocidas, quando comparados com células bacterianas livres. Esta resistência tem serias implicações econômicas e ambientais em vários sistemas industriais, como o alimentício e o médico, além de sistemas de distribuição de água.

Devido à resistência apresentada por biofilmes a antissépticos convencionais e antibióticos, a demanda por novos antimicrobianos para o controle do mesmo tem sido aumentada. Com isso, as atenções estão se voltando para o uso de compostos antimicrobianos naturais, o que instigou algumas investigações com relação aos efeitos de fitoquímicos. Entre esses estudos, há uma crescente pesquisa com relação aos óleos essenciais (Chorianopoulos et al., 2008).

Os óleos essenciais são produtos voláteis do metabolismo secundário de plantas aromáticas, formados em células especializadas e encontrados em folhas, flores, sementes, caules e raízes. De forma geral, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões & Spitzer, 2004). Devido ao seu versátil conteúdo de compostos, variando desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre, estes, têm demonstrado um bom potencial como agentes antibacteriano e antifúngico (Burt, 2004).

Embora a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tenha sido relatada em numerosos trabalhos, poucos estudos têm relacionado o mecanismo de ação desses produtos naturais na célula microbiana. Alguns autores relatam que as propriedades antimicrobianas desses compostos são associadas com seu caráter lipofílico, o que leva a um acúmulo na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo características de permeabilidade (Sikkema et al., 1994; Kakkali et al., 2008)

Em bactérias, a permeabilização da membrana é associada com perda de íons e redução do potencial da membrana, colapso da bomba de próton e depleção do ATP (Bakkali et al., 2008). Outras alterações de natureza antibacteriana devido à atuação de óleos essenciais são a coagulação do citoplasma (Gustafson et al., 1998) e a danificação de proteínas embebidas na membrana citoplasmática (Ultee et al., 1999).

A possível utilização de óleos essenciais como agentes antimicrobianos é assegurada pelo aumento na procura de produtos considerados como naturais.

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de a) avaliar a composição química dos óleos essenciais de *M. piperita*, *C. citratus*, *O. basilicum* e *O. majorana* e suas atividade antibacteriana frente a patógenos de origem alimentar, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella entérica*

Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazaki* e b) avaliar a ação antimicrobiana de soluções à base de óleo de *M. piperita* e *C. citratus* frente a biofilmes formados por *Escherichia coli* enteropatogênica e *Salmonella enterica* Enteritidis em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), utilizando contagem padrão em placas e MEV. A MEV foi realizada, nesta etapa do trabalho, no intuito de observar a ocorrência de alterações estruturais na superfície bacteriana, devido à ação antibacteriana dos óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilme

Biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos imobilizados conjuntamente em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) de origem microbiana. Eles representam a parte majoritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade (Xavier et al., 2003).

Bactérias vivem em biofilmes em vários ambientes, incluindo sistemas saturados, tais como plantas de tratamento de águas residuais e ambientes instaurados, como o solo (Wingender et al., 1999).

Quando ocorre a interação entre a bactéria e a superfície, o primeiro estágio é o de adesão reversível da bactéria com a superfície, o que acontece em um curto período. Neste estágio, forças de interação físico-químicas não específicas atuam entre as moléculas e estruturas da superfície do microrganismo e do substrato sólido (van der Waals, hidrofóbicas, eletrostáticas) (Bryers, 2000).

O estágio seguinte, de adesão irreversível, inicia-se quando as células tornam irreversivelmente aderidas à superfície. Nesta fase, as células perdem a motilidade; algumas delas aderem às outras, começa a excreção de polímeros extracelulares (polissacarídeos, lipopolissacarídeos e glicoproteínas), os quais formam a matriz polimérica extracelular (EPS). Como resultado da divisão celular compacta, microcolônias emergem, ligadas a esta matriz (Nikolaev & Plakunov, 2007).

Fatores ambientais e propriedades das células microbianas afetam o processo de formação do biofilme e suas características. Os mais importantes fatores ambientais são: pH, salinidade, osmolaridade, pressão parcial de

oxigênio, disponibilidade de nutrientes e hidrofobicidade. Os fatores bióticos também influenciam a adesão. A fase de crescimento de uma cultura bacteriana tem um alto grau de determinação da propriedade adesiva desta célula. A aumentada propriedade adesiva de células crescendo ativamente pode ser relacionada a sua motilidade. A presença de genes que reagem à adesão e são ativos somente em biofilmes, pode ser considerada um mecanismo genético específico para adesão. Existem também estruturas de superfície celular de grande importância na adesão como flagelos, pili tipo IV e de “moléculas de adesão” específicas lecitinas e adesinas e também antiadesinas (London, 1991).

A atividade de microrganismos em um biofilme é notavelmente diferente da que é observada quando estes estão na fase suspensa planctônica. As células microbianas fechadas na matriz do biofilme demonstram significantes vantagens em relação às células planctônicas, principalmente com relação à resistência a agentes agressivos, como antibióticos e desinfetantes e a radiação ultravioleta, a desidratação (EPS são altamente hidratados) e a proteção contra predadores, como protozoários (Ceri et al., 2001; Picioreanu et al., 2004).

Os exopolissacarídeos (EPS) sintetizados pelas células microbianas são amplamente variáveis em sua composição e, conseqüentemente, em suas propriedades físicas e químicas. Alguns são macromoléculas neutras, mas a maioria é polianiónica, devido à presença de ácido urônico (ácido D-glucurônico, sendo o mais comum, embora os ácidos D-galacturônico e D-manurônico sejam também encontrados) ou acetato ligado a piruvato. Resíduos inorgânicos, como fosfato ou raramente sulfato, podem também conferir um estado polianiónico (Sutherland et al., 2004).

O EPS cria um local de ambiente celular e atua como uma barreira seletiva entre a célula e o ambiente externo. O EPS, dependendo de sua composição, é capaz de: adsorver moléculas orgânicas e íons metálicos, aumentar a retenção de água e proteger canais do potencial de água, além de

alterar enzimaticamente o substrato e impedir o transporte de dentro para fora do biofilme. A quantidade e a qualidade do EPS mudam o ambiente local e, assim, afetam a fisiologia da célula, incluindo o aumento de nutrientes, a sinalização célula-célula e a expressão proteica. Assim, o EPS é um importante componente dos biofilmes, que deve ser entendido como parte de um completo conhecimento do biofilme bacteriano (Steinberger & Holden, 2004). A quantidade de EPS sintetizado dentro do biofilme depende da disponibilidade de fontes de carbono (ambos dentro e fora da célula) e do balanço entre carbono e outros nutrientes limitantes.

Os biofilmes têm importância em várias atividades humanas. Em estações de tratamento de águas ou de efluentes, removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica por meio de interações com o biofilme. Números bioprocessos também utilizam biofilmes. Alguns exemplos incluem a produção de vinagre e a de ácido cítrico, aplicações farmacêuticas por meio da produção de metabólitos secundários e processos biológicos para a extração de metais pesados a partir de minério (Rawlings, 2002).

O crescimento não desejado de biofilmes, em contrapartida, tem impacto negativo em várias atividades. Estragos em equipamentos devido à biocorrosão causada por biofilmes, contaminação de produtos, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida a transferências de calor e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos e representam perdas significativas para indústrias, em âmbito global. Tais problemas são agravados pela resistência aumentada a métodos de desinfecção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparados com células bacterias livres. Assim, os métodos convencionais de desinfecção não são suficientes e requerem, por vezes, doses elevadas de desinfetantes, indesejadas do ponto de vista ambiental (Simões et al., 2003).

A chave para uma efetiva limpeza em superfícies é o entendimento da natureza e do tipo da superfície a ser limpa, incluindo os microrganismos a serem removidos a partir da superfície. Uma vez que os microrganismos formam um biofilme firme, a limpeza e a desinfecção tornam-se muito mais difíceis. Além disso, antimicrobianos não penetram satisfatoriamente na matriz exopolissacarídica na superfície após inadequada limpeza e, assim, eles não destroem todas as células do biofilme (Wirtanen et al., 2001). Neste contexto, a investigação de novos produtos no controle de biofilmes demonstra elevada importância.

Investigações recentes revelam a atividade antimicrobiana de alguns produtos naturais derivados de plantas (Griffin et al., 1999; Delorenzi et al., 2006; Akendengue et al., 2002). Entre esses estudos, há uma crescente pesquisa com relação aos óleos essenciais, substâncias que possuem várias ações biológicas comprovadas, destacando-se a sua ação microbiológica.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões & Spitzer, 2004).

A International Standard Organization, ou ISO, define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos.

São, geralmente, incolores ou ligeiramente amarelados; poucos são os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor em azulenos. 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 é opticamente ativa, propriedades essas utilizadas na sua identificação e controle da qualidade (Simões et al., 2004; Oussalah et al., 2006).

Na natureza, os óleos essenciais exercem importante papel na proteção das plantas como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros. Podem agir também atraindo insetos, para favorecer a dispersão de polens e sementes ou repelir aqueles indesejáveis (Bakkali et al., 2008).

Os constituintes dos óleos essenciais variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (Simões et al., 2004).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pelos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou, ainda, nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (Robbers et al., 1997; Oussalah et al., 2006).

As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar perda quantitativa

importante do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K) também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode prever ou estabelecer um único padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada (Castro, 2006).

A utilização de produtos naturais extraídos de plantas é tão remota quanto a civilização na terra. Os egípcios utilizavam amplamente os extratos e óleos extraídos de plantas para tratamento farmacológico e também como conservante de alimentos. Com o desenvolvimento de novas técnicas de produção destes compostos e o desenvolvimento da Química, ocorreu melhoria na obtenção de óleos essenciais (Rates, 2001).

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (Tassou et al., 2000).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas diz respeito, principalmente, aos danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (Sikkema et al., 1994). Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo características de permeabilidade (Bakkali et al., 2008). A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam (Sikkema et al., 1995), de maneira que a resistência bacteriana frente a óleos essenciais parece estar relacionada à habilidade de partição dos componentes dos mesmos na fase lipídica da membrana (Lambert et al., 2001).

Em bactérias, a permeabilidade da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de metabólitos e íons potássio e fosfato (Lambert et al., 2001). Dessa forma, danos estruturais à

membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (Sikkema et al., 1994; Gill & Holley, 2006).

Outras alterações de natureza antibacteriana, devido à atuação de óleos essenciais, são a coagulação do citoplasma (Gustafson et al., 1998) e a danificação de proteínas embebidas na membrana citoplasmática (Knobloch et al., 1989; Ultee et al., 1999). Enzimas como ATPases estão localizadas na membrana citoplasmática e encontram-se envoltas por moléculas de lipídeos.

Dois possíveis mecanismos são propostos para a ação dos óleos essenciais em relação a proteínas da membrana citoplasmática. Moléculas lipofílicas capazes de se acumular na bicamada lipídica podem vir a danificar a interação lipídeo-proteína. Entretanto, a interação direta de compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas pode também ocorrer (Juven et al., 1994; Sikkema et al., 1995).

As propriedades antimicrobianas de plantas e seus óleos essenciais têm sido estudadas, principalmente com relação ao efeito inibidor sobre microrganismos patogênicos presentes em alimentos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKENDENGUE, B.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Klavanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvariana klaineana*. **Phytochemistry**, New York, v. 59, n. 8, p. 885-888, Apr. 2002.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 11, p. 1454-1458, Nov. 1998.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sept. 2008.

BRYERS, J. D. Biofilm formation and persistence. In: _____. **Biofilms II: process analysis and applications**. New York: J. Wiley, 2000. p. 45-88.

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

CASTRO, N. E. A. **Caracterização e fitoquímica de óleos essenciais de eucalipto e seu efeito sobre o protozoário tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai***. 2006. 82 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CERI, H.; OLSON, M.; MORCK, D.; STOREY, D.; READ, R.; BURET, A.; OLSON, B. The MBECassay system: multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. **Methods in Enzymology**, New York, v. 337, p. 377-385, 2001.

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

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. 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. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, Dec. 2008.

DELORENZI, J. C.; FREIRE-DE-LIMA, L.; GATTASS, C. R.; COSTA, D. de A.; HE, L.; GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-9, Apr. 2006.

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

GRIFFIN, S. G.; WYLLIE, S. G.; MARKHAM, J. L.; LEACH, D. N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 14, n. 5, p. 322-332, Sept./Oct.1999.

GUSTAFSON, M. M.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; WYLLIES, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

JUVEN, B.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 6, p. 626-631, June 1994.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERI, B.; WEGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 1, n. 1, p. 119-128, Feb. 1989.

KUEHNE, M. E.; SARAIVA, M. E. In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 7, p. 2111-2115, July 2002.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LONDON, J. Bacterial adhesines. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, San Diego, v. 26, p. 229-237, Jan. 1991.

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

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, p. 1046-1055, 2006.

PICIOREANU, C.; XAVIER, J. B.; LOOSDRECHT, M. C. M. van. Advances in mathematical modeling of biofilm structure. **Biofilms**, Great Britain, v. 1, n. 4, p. 337-349, 2004.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

RAWLINGS, D. E. “Heavy metal mining using microbes.” **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 65-91, Oct. 2002.

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

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. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFSC, 2004. p. 467-495.

SHELEF, L. A. Antimicrobial affects of spices. **Journal Food Safety**, Trumbull, v. 6, n. 1, p. 29-44, Feb. 1983.

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

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

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: Ed. da UFSC, 2004. 1102 p.

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: Ed. da UFSC, 2004. 1102 p.

SIMÕES, M.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. "Monitoring the effects of biocide treatment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms formed under different bow regimes". **Water Science and Technology**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 217-223, 2003.

STEINBERGER, R. E.; HOLDEN, P. A. Macromolecular composition of unsaturated *pseudomonas aeruginosa* biofilms with time and carbon source. **Biofilms**, Great Britain, v. 1, n. 4, p. 37-47, 2004.

SUTHERLAND, I. W.; HUGHES, K. A.; SKILLMAN, L. C.; TAIT, K. The interaction of phage and biofilms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 1-6, Mar. 2004.

TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 3/4, p. 273-280, Apr. 2000.

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

WALKER, J. T.; HANSON, K.; CALDWELL, D.; KEEVIL, C. W. Scanning confocal laser microscopy study of biofilm induced corrosion on copper plumbing tubes. **Biofouling**, Abingdon, v. 12, n. 4, p. 333-344, May 1998.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. What are bacterial extracellular polymeric substances? In: WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. **Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function**. Berlin: Springer, 1999. p. 1-19.

WIRTANEN, G.; SALO, I. M.; HELANDER, T. M. S. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on Pseudomonas biofilm. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 37-50, Jan. 2001.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VANLOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 76, p. 1-12, abr. 2003.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM BACTERIAS PATOGENICAS DE ORIGEM ALIMENTAR

1 RESUMO

Objetivou-se identificar e quantificar os constituintes e avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* contra cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazaki*. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada a partir de folhas secas, empregando-se a técnica de hidrodestilação e utilizando-se a aparelho de Clevenger modificado. A atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi determinada pelo método de difusão em ágar. Observou-se que os óleos essenciais inibiram o crescimento bacteriano, mas sua efetividade foi variada. Entre os óleos essenciais testados, *M. piperita* apresentou alta atividade antimicrobiana para *E. coli*, atividade moderada para *Salmonella* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e baixa atividade para *Listeria monocytogenes*. Já *Cymbopogon citratus* apresentou alta atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e atividade moderada frente a *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*. *Ocimum basilicum* apresentou alta atividade antibacteriana frente *E. coli* e *Enterobacter sakazakii*, moderada atividade frente a *Salmonella* Enteritidis e não apresentou atividade frente a *Listeria monocytogenes*. *Origanum majorana* também foi testado neste estudo e apresentou alta atividade antimicrobiana frente *E. coli*, atividade moderada para *Salmonella* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e baixa atividade para *Listeria monocytogenes*.

Palavras-chave: monoterpenos, patógenos de origem alimentar, propriedades antibacteriana.

2 ABSTRACT

The objective of this work was to identify and quantify the constituents and to evaluate the antimicrobial activity of essential oil of *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* and *Origanum majorana*, against enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Enterobacter sakazaki*. The essential oil were obtained from dried leaves by using the hydrodistillation technique and the modified Clevenger apparatus. The bacterial activity of the essential oil was determined by using the agar diffusion technique. Essential oil inhibited bacterial growth, but its effectiveness was varied. Among the essential oil tested, *M. piperita* showed high antimicrobial activity against *E. coli*, moderate activity for *Salmonella enterica* Enteritidis and *Enterobacter sakazakii* and low activity for *Listeria monocytogenes*. However, *Cymbopogon citratus* presented high antimicrobial activity against *E. coli* and moderate activity against *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella enterica* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Ocimum basilicum* showed high antimicrobial activity against *E. coli* and *Enterobacter sakazakii*, moderate activity against *Salmonella enterica* Enteritidis and it was inactive against *Listeria monocytogenes*. *Origanum majorana*, which was also tested in our work, showed high antibacterial activity against *E. coli*, moderate activity against *Salmonella enterica* Enteritidis and *Enterobacter sakazakii* and low activity against *Listeria monocytogenes*.

Key-word: monoterpenes, pathogenic feed source, antibacterial properties.

3 INTRODUÇÃO

Patógenos de origem alimentar são amplamente diversos na natureza e continuam sendo a maior causa de problemas mundiais de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esses agentes são responsáveis por considerável morbidade e mortalidade, além de resultar em custos com cuidados médicos, perda de produtividade e controle pela indústria de alimentos (Frantamico et al., 2007, Nedorostova et al., 2009). Nos países industrializados, a porcentagem de pessoas que são acometidas com doenças transmitidas por alimentos por ano chega a 30% da população. A cada ano, somente nos EUA, se estima um total de 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos, com 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes. Não existem dados documentados desses casos nos países em desenvolvimento, mas sabe-se que eles enfrentam graves problemas, devido à presença de uma grande variedade de patógenos. Entre os mais sérios patógenos de origem alimentar estão *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *E. coli*, os quais respondem pelo maior número de casos de doenças e mortes (Ricke et al., 2005; Oussalah et al., 2007).

Para reduzir doenças e danos econômicos causados por microrganismos patogênicos, o uso de produtos naturais como compostos antimicrobianos parecer ser uma maneira interessante de controlar a presença de bactérias patogênicas e estender a vida de prateleira de alimentos processados (Cowan, 1999; Filoche et al., 2005; Nedorostova et al., 2009), principalmente devido à prevalência de microrganismos resistentes a antissépticos e antibióticos convencionais e também pelo aumento do conceito popular sobre a qualidade de alimentos e do potencial impacto dos aditivos sintéticos na saúde. Assim, a crescente demanda do consumidor por produtos naturais efetivos e seguro tem levado a investigações com relação aos efeitos de fitoquímicos. Entre esses

estudos é crescente a pesquisa com relação aos óleos essenciais (Dorman & Deans, 2000; Draughon, 2004; Filoche et al., 2005).

Os óleos essenciais e seus componentes são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes presentes em plantas; eles podem também apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória. Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e seus derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, ester, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanoides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio. Geralmente, a composição do óleo essencial é um balanço de vários compostos, embora na maioria das espécies um constituinte prevaleça sobre o outro (Cowan, 1999, Bajpai et al., 2008).

Como os óleos essenciais e seus constituintes são extensivamente usados como ingredientes de *flavour* em uma ampla variedade de alimentos, bebidas e produtos de confeitaria, sua aplicação no controle de patógenos pode reduzir o risco de doenças de origem alimentar e assegurar ao consumidor produtos alimentícios seguros (Burt, 2004; Kotzekidou et al., 2008).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar e quantificar os constituintes e avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), manjerona (*Origanum majorana*), e manjeriço (*Ocimum basilicum*) frente os patógenos de origem alimentar *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enterica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazaki*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Os materiais vegetais utilizados para a extração de óleo essencial foram folhas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), manjerona (*Origanum majorana*), manjeriço (*Ocimum basilicum*) e erva doce (*Pimpinella anisium*). O material foi colhido no horto de plantas medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras, região sul de Minas Gerais (Brasil), a 21°14' S de longitude 45°00' W GR, a 918 m de altitude. As plantas foram coletadas em novembro de 2008, na parte da manhã, em dia com temperatura amena e sem precipitação pluviométrica.

4.1.1 Extração dos óleos essenciais e determinação do rendimento

O método empregado para extração dos óleos essenciais foi o de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado. O processo de extração foi realizado por um período de 2 horas, controlando-se a temperatura em, aproximadamente, 100°C.

4.1.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

As análises qualitativas e quantitativas dos óleos essenciais foram realizadas no laboratório METABIO, do Departamento de Química da Universidade Federal do Sergipe.

Análises qualitativas dos óleos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se aparelho Shimadzu CG-17^a, com detector seletivo de massa modelo QP 5050^a, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de

sílica fundida (30 m X 0,25mm) com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280°C; programação da coluna com temperatura inicial de 50°, por 2 minutos com aumento de 4°C/minuto até 200°C; depois, 10°C/minuto até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos; gás carreador hélio (1mL min⁻¹); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa split 1:83 e volume injetado de 0,5 µm (1% de solução em diclorometano). As condições para espectrômetro de massas (EM) foram: energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição 1000, intervalo de decomposição de 0,50 e fragmentos de 40 Da e 550Da decompostos. Foi injetada, nas mesmas condições das amostras, uma série de padrões de hidrocarbonetos (C₉H₂₀.....C₂₆H₅₄). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovat, calculando para cada constituinte de acordo com Adams (1995).

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa. Nesta análise, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG - 17 A, com detector por ionização de chama (FID), nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar (DB5); programação da coluna com temperatura inicial de 50°C, por 2 minutos, com aumento de 4°C/minutos, até 200°C; depois, 10°C/minutos até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos Utilizou-se como gás carreador o nitrogênio (2,2 mL.min⁻¹) e, ainda, taxa de split de 1:10 e volume injetado de 1 mL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

4. 2 Teste de atividade antibacteriana

4.2.1 Microrganismos

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella* entérica Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii*, provenientes da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

4.2.2 Padronização, estocagem e preparo do inóculo

Para a padronização do número de células, a cepa foi inicialmente inoculada em frasco Erlenmeyer contendo 150mL de meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia), o qual foi incubado a 37°C. Em seguida, a partir do TSB, a curva de crescimento foi determinada pela realização periódica de leituras da absorbância da cultura a 600nm e de diluições seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) com posterior plaqueamento em superfície para determinação do Log UFC. mL⁻¹, utilizando-se como meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia).

Durante a realização do experimento, a cepa foi estocada sob refrigeração em meio de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15ml de glicerol, 0,5g de peptona bacteriológica, 0,3g de extrato de levedura e 0,5g de NaCl, pH 7,2±7,4). Para ativação e utilização da cepa, uma alíquota do meio de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37°C, por 24 horas, neste meio de cultura. Em seguida, a cultura foi estriada em placas contendo TSA e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, foi retirada uma alçada e transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 150mL de TSB, o qual foi incubado a 37°C, até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento.

4.2.3 Determinação da atividade antimicrobiana

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar, de acordo com Mendonça (2004), com modificações. Como meio de cultura utilizou-se TSA. Para o preparo das cavidades de deposição dos óleos essenciais, uma camada inicial do meio de cultura foi depositada em placas de Petri, sobre as quais, após solidificação, foram dispostas pérolas de vidro. Uma sobrecamada do meio de cultura contendo o inócuo na concentração de, aproximadamente, $8 \text{ Log UFC. mL}^{-1}$, foi depositado sobre as pérolas de vidro dispostas na superfície da camada inicial. Após solidificação da sobrecamada, as pérolas de vidro foram removidas com o auxílio de pinças estéreis, dando origem às cavidades. Em seguida, $10 \mu\text{L}$ das diferentes concentrações (0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50), expressas em % (v/v) dos óleos essenciais de hortelã e capim-limão, manjerona, manjerição e erva-doce, diluídas em etanol, foram transferidas para as cavidades. A concentração 0% (v/v), constituída apenas de etanol, foi utilizada como controle positivo do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas, a 37°C , por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. O experimento foi realizado em três repetições e os resultados foram expressos como a média dos três valores. A atividade antibacteriana foi caracterizada pelo comprometimento do crescimento bacteriano, observado pela formação de halo de inibição. A menor concentração que apresentou atividade antimicrobiana foi definida como concentração mínima inibitória (CMI).

4.3 Análise dos dados

Os dados de atividade bactericida dos óleos essenciais obtidos pelo método de difusão em placa foram padronizados em unidades arbitrárias por mL (UA/mL) para, posteriormente, serem comparados entre si. Para a obtenção das UA/mL utilizou-se a fórmula:

$$\left[\frac{DH}{\text{Fator de diluição}} \right] \times 50$$

em que DH é o diâmetro inibitório para a menor concentração (em milímetros). De posse dos valores das UA/mL, procedeu-se a uma análise de variância, tendo os dados de UA dos óleos essenciais para cada bactéria sido transformados em raiz de $x+0,5$ e as medias comparadas pelo teste de Scott & Knott (1974) usando o pacote “Laercio” (Silva, 2008), compilado pelo software R[®] (2009).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* contra as quatro espécies de bactérias testadas, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella entérica* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii* está sumarizada na Tabela 1. Os resultados revelam que os óleos essenciais demonstraram atividade antimicrobiana em variadas magnitudes, sendo a maioria das bactérias testadas sensível aos óleos.

Os principais constituintes do óleo essencial de *M. piperita* identificados e quantificados foram mentol (68,21%), mentona (10,95%) acetato de metila (6,65%) e iso-mentona (4,82%). Prévias investigações da composição são consistentes com nossos resultados, segundo os quais mentol e mentona são encontrados como compostos majoritários. Iscan et al. (2002) elucidaram, por GC e GC/MS, a composição e relativa porcentagem de quatro amostras de óleos essenciais de *M. piperita* de fontes distintas. Os resultados demonstraram que as amostras continham mentol (28%-42%) e mentona (18%-28%) como os principais constituintes.

TABELA 1 Atividade bactericida (UA/mL $\pm$ EP) dos diferentes óleos essenciais para *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii*.

Bactéria	Atividade do óleo essencial (UA/mL $\pm$ EP) ¹								CV (%)
	<i>Mentha piperita</i>		<i>Cymbopogon citratus</i>		<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Origanum majorana</i>		
<i>S. Enteritidis</i>	1.706,67 $\pm$ 282,21	b C	2.773,33 $\pm$ 213,33	a B	1.600,00 $\pm$ 184,75	b B	1.706,67 $\pm$ 213,33	b B	10,48
<i>E. coli</i>	8.106,67 $\pm$ 1.128,85	a A	9.386,67 $\pm$ 853,33	a A	6.826,67 $\pm$ 853,33	a A	5.973,33 $\pm$ 426,67	a A	9,79
<i>L. monocytogenes</i>	106,67 $\pm$ 6,67	b D	2.773,33 $\pm$ 213,33	a B	0,00 $\pm$ 0,00	c C	0,00 $\pm$ 0,00	c C	10,85
<i>E. sakazakii</i>	3.200,00 $\pm$ 369,50	b B	2.773,33 $\pm$ 213,33	b B	8.106,67 $\pm$ 426,67	a A	2.346,67 $\pm$ 213,33	b B	7,05

Medias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha ou maiúscula na mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974) ($P \leq 0,05$).

Óleo essencial de *M. piperita* apresentou alta atividade antimicrobiana para *E. coli*, atividade moderada para *Salmonella* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e baixa atividade para *Listeria monocytogenes*. Vários estudos têm avaliado a atividade antibacteriana de *M. piperita* (Cowan, 1999, Tassou et al., 2000, McKay & Blumberg, 2006). Mentol tem sido relatado como sendo o composto responsável pela atividade antimicrobiana de *M. piperita* (Sivropoulou, 1995) e foi apresentado como ativo contra *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aeraerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus Vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, inibindo estes microrganismos em concentrações de 10 µL por placa, utilizando o método de plaqueamento em ágar (Iscan et al., 2002). Contudo, alguns estudos sugerem que mentol não parece ser o único agente responsável pela propriedade antimicrobiana de *M. piperita*. Yadegarinia et al. (2006) observaram alta atividade antimicrobiana de óleo essencial de *M. piperita* com concentrações baixas de mentol (3,6%). Assim, pode-se deduzir que outros compostos químicos presentes no óleo também contribuem para alta atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. piperita*.

Na avaliação, o óleo essencial de *C. citratus* apresentou, em sua constituição, 38,43% de geranial, 31,12% de neral, 4,21% de linalol e 2,53% de mirceno. Geranial e neral são estereoisômeros e sua mistura constitui o citral. Assim, o citral é uma mistura isomérica de geranial [(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral A ou isômero E] e neral [(2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral B ou isômero Z] (El Fattah et al., 1992). Observa-se que os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. citratus* utilizado neste estudo assemelha-se aos encontrados nos trabalhos consultados. Oliveira et al. (2009) encontraram, como constituintes do óleo essencial de *C. citratus*, geranial (42,91%), neral (30,90%), linalol (1,51%) e mirceno (1,36%).

Cymbopogon citratus apresentou alta atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e atividade moderada frente a *Enterobacter sakazakii*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes*.

Doran et al. (2008) demonstraram que o óleo essencial de *C. citratus* inibiu bactérias resistentes a antibióticos em concentrações muito baixas (0,06%). Onawunmi (1989), ao avaliar a atividade de citral frente a bactérias e fungos, constatou que a mínima concentração inibitória obtida para *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *M. gypseum* foi de 0,05% (v/v), enquanto para *A. fumigatus* foi de 0,08% (v/v). Segundo este autor, 0,01% de citral levou a uma ligeira inibição no crescimento de *E. coli*; já em concentrações mais altas (0,03%, 0,05%, 0,08% e 0,1%), citral demonstrou rápida diminuição na viabilidade da contagem final de células.

Entre os óleos essenciais avaliados, apenas *C. citratus* apresentou atividade frente à *Listeria monocytogenes*. Esses achados estão de acordo com os de Oussalah et al. (2007) que também observaram superioridade na atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. citratus* frente a *L. monocytogenes*, tendo a CMI encontrada para o óleo essencial sido de 0,4% (v/v). Lis-Balchin & Deans (1997) observaram forte atividade antilisterial de *C. citratus* e encontraram uma correlação entre essa atividade e o alto conteúdo de geranial e neral. A moderada atividade registrada pelo método de difusão em Agar, neste estudo, pode ser atribuída à baixa afinidade entre componentes menos polares, como neral e geranial e o substrato polar (ágar), o que pode diminuir atividade do óleo essencial de *C. citratus*.

Apesar de as atividades antimicrobianas e antifúngicas do óleo essencial de *C. citratus* serem atribuídas ao citral (Guerra et al., 2000), é possível que a atividade dos principais componentes seja modulada por outras moléculas que estão presentes em menor quantidade. Onawunmi et al. (1984) demonstraram sinergismo entre os componentes do óleo, observando que mirceno não

apresentou atividade antimicrobiana, mas, quando associado ao citral, potencializou seu efeito. É possível que a atividade dos principais componentes seja modulada por moléculas menores (Hoet et al., 2006; Bakkali et al., 2008).

Óleo essencial de *Ocimum basilicum* apresentou alta atividade antibacteriana frente *E. coli* e *Enterobacter sakazakii*; moderada atividade frente a *Salmonella Enteritidis* e não apresentou atividade frente a *Listeria monocytogenes*. Segundo Sinha & Gulati (1990), o óleo essencial de *Ocimum basilicum* de varias regiões foi efetivo contra *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella thyphi*, *Samonella paratyphi*, *Shigella boydii* e *Proteus vulgaris*. Deans & Ritcie, ao avaliaram vários óleos essenciais (incluindo *O. basilicum*), quanto à sua propriedade antimicrobiana contra 25 gêneros de bactérias, utilizando a técnica de difusão em ágar, constataram que a maioria das bactérias testadas, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *B. subtilis*, *Brevibacterium linens*, *Brocothrix thermosphacta*, *Erwinia carotovora*, *E. coli*, *Lueconostoc cremoris*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* e *Yersinia enterocolitica*, apresentou ampla sensibilidade ao óleo essencial de *O. basilicum*.

O óleo essencial de *O. basilicum* apresentou, em sua constituição, 59,19% de linalol, 13,74% de 1,8 cineol, 6,91% de cinamato de metila, 3,94% de α -epi-cadinole e 2,44% de metil chavicol. Sua atividade antibacteriana pode ser, em parte, devido, à presença do alto conteúdo de linalol (Sartoratto et al., 2004; Koutsoudaki et al., 2005; Sokovic & Griensven, 2006).

A atividade antimicrobiana dos principais constituintes do óleo essencial de *O. basilicum* (Linalol, 1,8 cineol, methyl chavicol, eugenol e metil cinamato) foi também estudada. Pattnaik et al. (1997) avaliaram as propriedades antibacterianas dos constituintes aromáticos de óleos essenciais. Os resultados dos testes demonstraram que linalol foi o mais efetivo composto, inibindo 17 das 18 cepas bacterianas. Álcoois são conhecidos por possuir atividade bactericida em vez de bacteriostática contra células vegetativas. O álcool terciário linalol é

ativo contra microrganismos testados, potencialmente atuando tanto como um agente de desnaturação proteica ou como um solvente desidratante (Suppakul et al., 2002).

Knobloch et al. (1989) avaliaram a atividade antimicrobiana dos componentes do óleo essencial de *O. basilicum* contra bactérias gram-negativas (e.g. *Enterobacter aerogenes* e *P. Vulgaris*), bactérias gram-positivas (e.g. *S. aureus* e *B. subtilis*) e fungos (e.g. *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus* e *P. expansum*). Estes autores constataram que linalol, com alta solubilidade em água, teve significativa atividade antimicrobiana, quando comparado a outros compostos, como cinamaldeído, citral, geraniol, eugenol e mentol, ao passo que metil chavicol, com sua baixa solubilidade, apresentou uma menor atividade antimicrobiana.

A solubilidade em água dos constituintes dos óleos essenciais está diretamente relacionada à sua capacidade de penetrar na parede celular de fungos e bactérias. Contudo, a atividade antimicrobiana desses óleos deve-se à sua solubilidade na bicamada lipídica da membrana celular (Knobloch et al., 1989; Suppakul et al., 2002).

Óleo essencial de *Origanum majorana* também foi testado neste estudo e apresentou alta atividade antimicrobiana frente *E. coli*, atividade moderada para *Salmonella* Enteritidis e *Enterobacter sakazakii* e não apresentou atividade antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes*.

Para os constituintes do óleo essencial do *O. majorana* utilizado, as proporções e as substâncias identificadas foram: 38,17% de terpinen-4-ol, 7,71% de γ -terpineno, 6,50% de p-cimeno e 3,84% de α -terpineno. Bussata et al. (2008), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *O. majorana* frente a dez espécies de bactérias, observaram que todos os microrganismos testados foram suscetíveis à ação do óleo essencial, com valores

de MIC a partir de 0,069 a 2.3 mg/mL. Deans & Svoboda (2006), em um estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo de *O. majorana* sobre 25 bactérias, mostraram um poder inibitório sobre considerável número de bactérias.

A atividade antibacteriana apresentada pelo óleo pode ser devido a terpinen-4-ol e γ -terpineno. γ -Terpineno tem sido relatado por apresentar significativa atividade antimicrobiana (Carson & Riley, 1995; Cosentino et al., 1999) e terpinen-4-ol tem sido citado por apresentar atividade bacteriostática contra alguns microrganismos (Barel et al., 1991). Contudo, os compostos que são encontrados em menor quantidade, como p-cimeno e α -terpineol, podem também contribuir para atividade antimicrobiana dos óleos (Carson & Riley, 1995; Pattnaik et al., 1997; Cosentino et al., 1999; Tabanca et al., 2001), sendo possível que estejam envolvidos em algum tipo de sinergismo com outros compostos ativos (Marino et al., 2001; Xianfei et al., 2007).

A maior atividade de óleo essencial frente a *E. coli*, *Salmonella*, *Enteritidis* e *Enterobacter sakazakii* e a menor atividade frente a *Listeria monocytogenes* diferem da maioria dos estudos que relatam que bactérias gram-positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do que as gram-negativas (Davison, 1997). Entretanto, alguns estudos não confirmam estas observações. Burt (2004) afirma que bactérias gram-positivas têm sido menos ou igualmente sensíveis a bactérias gram-negativas. Doran et al. (2009), avaliando a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *C. citratus*, demonstraram que este óleo inibiu bactéria resistente a antibiótico a baixas concentrações (0,06%). Além disso, foi observado também que bactéria gram-positiva foi menos susceptível do que gram-negativa. Ao estudarem a atividade antimicrobiana de 22 óleos essenciais frente a 10 cepas bacterianas, Kotzekidou et al. (2008) demonstraram que *S. typhimurium* (gram-negativa) foi a cepa mais sensível, sendo inibida por 17 dos compostos testados, enquanto *L. monocytogenes* (gram-positiva) foi a cepa mais resistente, sendo inibida por somente quatro dos compostos testados.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com estas observações, uma vez que *Listeria monocytogenes* apresentou maior resistência aos óleos testados quando comparada às bactérias gram-negativas. Randrianarivelo et al. (2009), ao avaliarem amostras de óleos essenciais de *Cinnamosma fragrans* originárias de duas regiões em Madagascar, Tsaramandrosa (B8) e Mariarano (B143), frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, observaram que cepas de *Micrococcus* foram mais resistentes aos óleos B134, sendo tão resistente quanto cepas de *Salmonella* ao óleo B8.

A permeabilidade da membrana bacteriana, a presença de proteínas porinas em bactérias gram-negativas e a distribuição intracelular dos constituintes dos óleos essenciais são elementos chaves que influenciam a difusão e a ação dos óleos essenciais dentro das células, sendo, então, a variação na atividade dos óleos essenciais esperada contra diferentes grupos de bactérias (Lambert et al., 2001; Randrianarivelo et al., 2009).

Neste estudo foi também observado que, em geral, os óleos essenciais apresentam alta atividade antimicrobiana contra *E. coli*, concordando com outros estudos. Hammer et al. (1999), usando a técnica de difusão em Agar, concluíram que *E. coli* foi mais sensível do que uma cepa selecionada de *S. typhimurium* para a maioria dos óleos essenciais testados (Penalver et al., 2005).

A diferença encontrada entre a composição química dos óleos essenciais deste estudo e a composição química dos óleos essenciais de alguns trabalhos já realizados pode ser atribuída ao fato de que os óleos essenciais são um grupo heterogêneo de misturas de substâncias orgânicas nas quais os constituintes e suas concentrações relativas não dependem somente da espécie da planta. Entre outros fatores que influenciam a composição química, os mais importantes são a origem da planta, a parte da planta utilizada, o estágio de desenvolvimento da planta, as condições climáticas e de crescimento, como temperatura, solo e fertilizantes e as condições de destilação e estocagem (Ozcan & Erkmen, 2001;

Oladimeji et al., 2001). Entretanto, a maioria componentes majoritários encontrados nos óleos essenciais estudados foi semelhante aos encontrados nos trabalhos consultados.

Essa diferença apresentada na constituição e na concentração dos óleos essenciais influencia diretamente na atividade antimicrobiana. Assim, a diferença na atividade antimicrobiana existente entre os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, como observado entre os óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Origanum majorana* e *Ocimum basilicum*), é relacionada à concentração e à natureza de seus constituintes químicos (Chang et al., 2001).

Com relação aos óleos essenciais estudados, os constituintes majoritários encontrados foram monoterpenos. A ação antimicrobiana dos monoterpenos tem sido explicada pelo seu efeito tóxico na estrutura e na função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão, preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana (Sikkema et al., 1994), o que resulta em expansão da membrana, aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, desordenando as proteínas embebidas na membrana, inibindo a respiração e alterando o processo de transporte de íons (Trombeta et al., 2009). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções, como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (Sikkema et al., 1994).

A capacidade apresentada pelos óleos essenciais em inibir o crescimento bacteriano permite que os mesmos sejam utilizados como antimicrobianos na indústria de alimentos.

6 CONCLUSÃO

Os compostos majoritários encontrados foram mentol e mentona para *M. piperita*, geranial e neral para *C. citratus*, linalol e 1,8 cienol para *O. basilicum*, e terpinen-4-ol e p-cimeno para *O. majorana*.

Os resultados deste estudo demonstraram que os óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* apresentaram significativa atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella entérica* Enteritidis e *Enterobacter sakazaki*. Contudo, somente o óleo essencial de *C. citratus* apresentou atividade frente a *Listeria monocytogenes*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. 479 p.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; SUN C. K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 2, p. 117-122, July 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sept. 2008.

BAREL, S.; SEGAL, R.; YASHPHE, J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 33, n. 1/2, p. 187-191, May/June 1991.

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

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 207-211, July 2008.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 264-269, Mar. 1995.

CHANG, W. C.; HSU, F. L. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thunb. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Oxford, v. 45, n. 4, p. 307-312, Apr. 1991.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 130-135, Aug. 1999.

- COWAN, M. M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Oct. 1999.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. New York: AMS, 1997. p. 520-556.
- DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, p. 165-180, 1987.
- DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 5, n. 3, p. 187-190, Sept. 1990.
- DORAN, A. L.; MORDEN, W. E.; DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 387-392, Apr. 2009.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.
- DRAUGHON, F. A. Use of botanicals as biopreservatives in foods. **Food Technology**, Chicago, v. 58, n. 2, p. 20-28, Feb. 2004.
- EL FATTAH, M. A.; EL ZAHWEY, A. M.; HARIDY, I. M.; EL DEEB, S. A. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofiya Journal Agriculture Research**, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.
- FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 20, n. 4, p. 221-225, Aug. 2005.
- FRANTAMICO, P. M.; BHUNIA, A. K. J.; SMITH, L. Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 60, n. 24, p. 1180, Sept. 2007.

- GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. M. A. Relevância sanitária de *Listéria monocytogenes* nos produtos lácticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, Lisboa, v. 94, n. 530, p. 142-148, 1999.
- HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 985-990, June 1999.
- HOET, S.; STE´VIGNY, C.; HE´RENT, M. F.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, n. 5, p. 480-482, Apr. 2006.
- ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CANBASER, K.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, July 2002.
- KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERI, B.; WEGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 1, n. 1, p. 119-128, Feb. 1989.
- KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2008.
- KOUTSOUDAKI, C.; KRSEK, M.; RODGER, A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* Var. chia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 20, p. 7681-7685, 2005.
- LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 82, n. 6, p. 759-762, June 1997.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from lamiaceae and compositae.

International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 67, n. 3, p. 187-195, Aug. 2001.

MCKAY, D.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 7, p. 519-530, July 2006.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NEDOROSTOVA, L.; KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; STOLCOVA, M.; PULKRABEK, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 2, p. 57-160, Feb. 2009.

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, O. O.; OKEKE, I. N.; DAGNE, E. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, Stuttgart, v. 11, n. 2, p. 64-67, 2001.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSOS, 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, p. 549-553, Apr. 2009.

ONAWUNMI, G. O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 105-108, Sept. 1984.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 6, p. 658-660, June 2001.

PATTNAIK, S.; SUBRAMANYAM, V. R.; BAPAJI, M.; KOLE, C. R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbios**, Cambridge, v. 89, n. 358, p. 39-46, 1997.

PENALVER, P.; HUERTA, B.; BERGE, C.; ASTORGA, R.; ROMERO, R.; PEREA, A. Antimicrobial activity of five essential oils against strains of the *Enterobacteriaceae* family. **APMIS**, Copenhagen, v. 113, n. 1, p. 1-6, 2005.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 20 out. 2009.

RANDRIANARIVELO, R.; SARTER, S.; C ODOUX, E.; BRAT, P.; LEBRUN, M.; ROMESTAND, B.; MENUT, C.; ANDRIANOELISOA, H. S.; RAHERIMANDIMBY, M.; DANTHU, P. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamomum fragrans*. **Food Chemistry**, London, v. 114, n. 2, p. 680-684, May 2009.

RICKE, S. C.; KUNDINGER, M. M.; MILLER, D. R.; KEETON, J. T. Alternatives to Antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and foodborne pathogen response. **Poultry Science**, Champaign, v. 84, n. 4, p. 667-675, Apr. 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, out./dez. 2004.

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

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

SILVA, L. J. **Laercio**: duncan test, tukey test and scott-knott test. R package version 1.0-0. São Paulo: Atheneu, 2008. 5 p.

SINHÁ, G. K.; GULATI, B. C. Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents. **Indian Perfumer**, Índia, v. 34, n. 2, p. 126-129, 1990.

SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T. Antimicrobial activity of mint essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 9, p. 2384-2388, Sept. 1995.

SOKOVIC, M.; GRIENSVEN, L. J. L. D. van. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 116, n. 3, p. 211-224, Nov. 2006.

SUPPAKUL, P.; MILTZ, J.; SONNEVELD, K.; BIGGER, S. W. Preliminary stud of antimicrobial films the containing principal constituents of basil. In: IAPRI WORLD CONFERENCE ON PACKAGING, 13., 2002, East Lansing. **Proceeding...** East Lansing: CRC, 2002. p. 834-839.

TABANCA, N.; KIRIMER, N.; DEMIRCI, B.; DEMIRCI, F.; BASER, K. H. C. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric distribution of borneol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4300-4303, Sept. 2001.

TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutriente broth by mint essential oil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 3/4, p. 273-280, Apr. 2000.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTAI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, June 2005.

XIANFEI, X.; XIAOQIANG, C.; SHUNYING, Z.; GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Chaenomeles speciosa* from China. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 4, p. 1312-1315, 2007.

YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; REZAEI, B. M.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, June 2006.

CAPÍTULO 3

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Escherichia coli* EM AÇO INOXIDÁVEL E AÇÃO SANIFICANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

1 RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de investigar a ação antibacteriana de soluções à base de óleos essenciais de *C. citratus* e *M. piperita*, frente ao biofilme formado por *Escherichia coli* INCQS 184. O biofilme foi formado em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), por 240 horas, a 35°C e, subsequentemente, foi tratado com as soluções à base de óleos essenciais por 10, 20 e 40 minutos, na concentração de 7,8% (v/v). As soluções à base de óleo essencial se apresentaram efetivas, reduzindo o número de células aderidas, principalmente após 20 e 40 minutos de contato, obtendo-se uma redução de 100%. A atividade antibacteriana dos óleos essenciais pode ser evidenciada pelas mudanças morfológicas apresentadas pelas células tratadas com óleo essencial de *M. piperita* e *C. citratus*, observadas pela MEV. Os óleos essenciais podem ser uma boa alternativa para serem utilizados como sanitizantes na superfície de equipamentos das indústrias de alimentos.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, microscopia eletrônica de varredura

2 ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antibacterial action of solutions based on essential oil of *Mentha piperita* and *Cymbopogon citratus* against the biofilm formed by *Escherichia coli* INCQS 184. Biofilm was formed on stainless steel surface AISI 304 (#4) after 240h at 35 °C. Subsequently, the biofilm was treated with solutions of essential oil during 10, 20 and 40 minutes, at a concentration of 7,8% (v/v). Solutions of essential oil presented effective reducing the adhered cells number, mainly after contact of 20 and 40 min. After these periods it was possible observe a 100% reduction in the adhered cells number. The antibacterial activity of essential oil could be observed by SEM which showed morphological changes of cells treated with *M. piperita* and *C. citratus* essential oil. Essential oil can be a good alternative to be used as sanitizers on the surface of equipment from food industries.

Key-word: Antimicrobial activity, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, scanning electron microscopy.

3 INTRODUÇÃO

A adesão de microrganismos a superfícies e equipamentos utilizados no processamento de alimentos e os problemas que estes causam são assuntos preocupantes para a indústria de alimentos. Biofilmes têm potencial para atuar como fonte crônica de contaminação microbiana, podendo comprometer a qualidade dos alimentos e representar um perigo para a saúde (Barnes et al., 1999). Microrganismos sésseis apresentam vantagens, uma vez que são mais difíceis de serem removidos mecanicamente a partir de superfícies em contato com alimentos (Efstathios & Nychas, 2006) e são mais resistentes a desinfetantes e agentes sanitizantes, quando comparados às células planquitônicas, o que agrava os problemas causados pelos biofilmes e contribui para a ineficiência da higienização (Barnes et al., 1999; Efstathios & Nychas, 2006).

Atualmente, são prioridades, nas indústrias de alimentos, a limpeza e a sanitização para minimizar o risco de contaminação por biofilmes. Pesquisas de novas substâncias para a eliminação de biofilmes são, portanto, uma nova área com potencial promissor.

O uso de agentes antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa efetiva ou suplementar para o controle de microrganismos (Knowles et al., 2005). Entre esses produtos, os óleos essenciais de plantas condimentares, aromáticas e medicinais têm demonstrado possuir atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de microrganismos. Contudo, até o momento, há poucos dados disponíveis sobre a avaliação de óleos essenciais como sanitizantes frente a biofilmes (Chorianopoulos et al., 2008, Oussalah et al., 2007).

Em vários estudos tem sido relatado que microrganismos patogênicos de origem alimentar, como *E. coli*, podem facilmente aderir e formar biofilmes em superfícies em contato com alimentos como aço inoxidável, vidro e plástico (Riva et al., 2007, Pawar et al., 2005). A associação com superfícies sólidas é uma estratégia que não somente *E. coli*, mas outras bactérias utilizam para sobreviver em condições subótimas.

Escherichia coli é um microrganismo tipicamente de origem fecal, usado como indicador de qualidade sanitária da água e de ambientes de processamento de alimentos. Pela aquisição específica de fatores de virulência as cepas de *E. coli* têm se tornado um patógeno notório, causando um amplo espectro de doenças e representando um risco para a saúde da população mundial.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana de soluções à base de óleo essencial de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) frente a biofilme formado por *Escherichia coli* 184 em superfície de aço inoxidável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos utilizados, padronização, preparação e estocagem do inóculo

O microrganismo utilizado foi *Escherichia coli* 184, proveniente da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (Rio de Janeiro, RJ). Para a padronização do número de células, as cepas foram inicialmente inoculadas em frasco Erlenmeyer contendo 150mL de caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®) e incubadas a 37°C. A curva de crescimento da bactéria foi determinada por leituras periódicas da absorbância a 600nm e diluições seriadas em solução salina [NaCl 0,9% 9p/v). Subsequentemente, realizou-se plaqueamento de 0,1 ml da diluição adequada em superfície para determinação do Log UFC. mL⁻¹, em ágar triptona de soja (TSA) (Himedia®).

Para o experimento, a cepa foi estocada, sob refrigeração, em meio de cultura de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15ml de glicerol, 0,5g de peptona bacteriológica, 0,3g de extrato de levedura e 0,5g de NaCl; pH 7,2±7,4). Para ativação e utilização da cepa, alíquota do meio de cultura de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos em TSB, com incubação a 37°C, por 24 horas. Em seguida, a cultura foi estriada em placas contendo TSA e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, algumas foram removidas e transferidas para frasco Erlenmeyer contendo 150 ml de TSB, os quais foram incubados a 37°C, até a obtenção do número de células necessárias para o experimento, aproximadamente 8 log UFC mL⁻¹ (OD_{600 nm} = 1.320).

4.2 Modelo experimental de formação do biofilme

O modelo experimental de formação do biofilme por *Escherichia coli* foi elaborado segundo sistema proposto por Gram et al. (2007) e em suporte de aço

inoxidável AISI 304 (#4), composto por duas divisões, cada qual dando lugar ao apoio de vinte cupons de aço inoxidável AISI 304, com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm, dispostos verticalmente. O conjunto suporte e cupons foi colocado em um béquer de 1.000 mL, o qual continha uma barra magnética e permaneceu acomodado sobre um agitador magnético, utilizado com a finalidade de permitir a livre circulação do substrato dentro do béquer. O bequer foi lacrado com auxílio de placa de Petri e filme plástico.

4.3 Preparação dos cupons e suporte de aço inoxidável

Para iniciar o estágio de formação do biofilme, os cupons e o suporte de aço inoxidável foram previamente higienizados e esterilizados. Inicialmente, eles foram limpos com acetona 100%, lavados por imersão em detergente alcalino [NaOH 1% (p/v), pH 13,2), por 1 hora, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, eles foram lavados com água destilada estéril, secos por duas horas a 60°C e autoclavados, a 121°C, por 15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

4.4 Formação do biofilme

O suporte de aço inoxidável contendo os cupons foi disposto no interior de um béquer de 1.000 mL, juntamente com uma barra magnética. Em seguida, foram adicionados ao béquer 900 mL de TSB previamente estéril e 1 mL de TSB contendo a cultura bacteriana, perfazendo a concentração final de, aproximadamente, 8 Log UFC.mL⁻¹. O béquer foi lacrado e incubado a 37°C, sob agitação de 50 rpm. A cada 48 horas, os cupons foram removidos do suporte, lavados com tampão fosfato salino estéril (PBS, pH 7,4), removendo-se, assim, as células não aderidas. Após lavagem, os cupons foram novamente dispostos em um novo suporte estéril e imersos em um novo béquer contendo

900 mL de TSB, ambos esterilizados. Esse procedimento foi repetido por cinco vezes, visando à completa formação de biofilme após incubação (Joseph et al., 2001).

4.5 Materiais vegetais

Os materiais vegetais utilizados para a extração de óleo essencial foram folhas secas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). O material foi colhido no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado na cidade de Lavras, região Sul de Minas Gerais (Brasil), a 21°14'S, longitude 45°00' W GR r 918 m de altitude. As plantas foram coletadas em novembro de 2008, na parte da manhã, em dia com temperatura amena e sem precipitação pluviométrica

4.5.1 Extração dos óleos essenciais

O método empregado para a extração dos óleos essenciais foi o de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado. O processo de extração foi realizado por duas horas, controlando-se a temperatura em, aproximadamente, 100°C.

4.5.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

As análises qualitativas dos óleos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se aparelho Shimadzu CG-17^a, com detector seletivo de massa modelo QP 5050^a, sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25mm) com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280°C; programação da coluna com temperatura inicial de 50°, por 2

minutos, com aumento de 4°C/min, até 200°C; depois, 10°C/min até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos; gás carreador hélio (1 mL min⁻¹); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa split 1:83 e volume injetado de 0,5 µm (1% de solução em diclorometano). As condições para espectrômetro de massas (EM) foram: energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição 1.000, intervalo de decomposição de 0,50 e fragmentos de 40 Da e 550Da decompostos. Foi injetada, nas mesmas condições das amostras, uma série de padrões de hidrocarbonetos (C₉H₂₀.....C₂₆H₅₄). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovat, calculado para cada constituinte, de acordo com Adams (1995)

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas por cromatografia gasosa. Nesta análise, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG - 17 A, com detector por ionização de chama (FID), nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar (DB5); programação da coluna com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, com aumento de 4°C/minuto até 200°C; depois, 10°C/minuto até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C por 10 minutos. Utilizou-se, como gás carreador, o nitrogênio (2,2 mL.min⁻¹); a taxa de split foi de 1:10, o volume injetado foi de 1 mL (1% de solução em diclorometano) e a pressão na coluna, de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

4.5.3 Determinação da atividade antimicrobiana

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar, de acordo com Mendonça (2004), com modificações. Como meio de cultura utilizou-se TSA. Para o preparo das cavidades de deposição dos óleos essenciais, uma camada inicial do meio de cultura foi depositada em placas de Petri, sobre as quais, após solidificação, foram dispostas pérolas de vidro. Uma sobrecamada do meio de

cultura contendo o inócuo na concentração de, aproximadamente, 8 Log UFC. mL⁻¹, foi depositada sobre as pérolas de vidro dispostas na superfície da camada inicial. Após solidificação da sobrecamada, as pérolas de vidro foram removidas com o auxílio de pinças estéreis, dando origem às cavidades. Em seguida, 10µl das diferentes concentrações (0; 0,39; 078; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50), expressas em porcentagem (v/v) dos óleos essenciais de *M. piperita* e *C. citratus*, foram diluídas em etanol e transferidas para as cavidades. A concentração de 0% (v/v), constituída apenas de etanol, foi utilizada como controle positivo do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas, a 37°C, por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. A atividade antibacteriana foi caracterizada pelo comprometimento do crescimento bacteriano, observado pela formação de halo de inibição. A menor concentração que apresentou atividade antimicrobiana foi definida como concentração mínima inibitória (CMI).

4.5.4 Tratamento dos cupons com óleos essenciais

Após 240 horas de formação de biofilme nos cupons de aço inoxidável, os mesmos foram submetidos a tratamentos com óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), na concentração de 7,8%, correspondente à mínima concentração inibitória previamente definida. Os cupons de aço inoxidável foram removidos do suporte e mergulhados, por três vezes, em solução salina, removendo-se, assim, as células não aderidas. Em seguida, foram imersos em soluções alcoólicas de 2 mL de óleos essenciais, em concentração de 7,8% e solução controle, durante 10, 20 e 30 minutos, em temperatura ambiente, sob condições estáticas.

4.6 Enumeração das células do biofilme

As células bacterianas foram enumeradas pela contagem padrão em placas durante a formação do biofilme (48, 96, 144, 192 e 240 horas) e após o tratamento com os óleos essenciais (240 horas). Foram retirados, aleatoriamente, dois cupons de aço inoxidável, com pinça esterilizada, os quais foram imersos separadamente em 10 mL de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto, para a remoção das células não aderidas. Em seguida, as sésseis foram removidas utilizando-se *swabs* estéreis. Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (p/v) e agitados em vórtex por 2 minutos. Diluições até 10^{-10} foram preparadas e alíquotas de 100µL foram inoculadas na superfície de placas de Petri contendo TSA. As placas foram incubadas a 35°C, por 24 horas e foi determinado o número de células viáveis em UFC. cm⁻².

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

Um cupom de cada cultura bacteriana contendo células aderidas, com tratamento e sem tratamento com óleos essenciais, foi tratado com fixador Karnovsky modificado (pH 7,2), por um período de 15 dias. Em seguida, foi lavado com tampão cacodilato três vezes, por 10 minutos e tratadas com tetróxido de ósmio por quatro horas, sendo este retirado com água destilada (três lavagens). Posteriormente, realizou-se a desidratação do material em acetona usando séries de 25%, 50%, 75%, 90% (uma vez de 10 minutos) e 100% (três vezes, por 10 minutos cada). Após as etapas descritas anteriormente, as amostras foram acondicionadas em porta-amostras e levadas para secagem em secador de ponto crítico e, posteriormente, montadas em stubs com fita dupla face de carbono e levadas ao sputtering para metalização com ouro. Realizada a metalização, as amostras foram visualizadas e imagens digitais foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura MEV LEO Evo 40.

4. 8 Análise estatística

Os dados de crescimento de *E. coli* foram submetidos a análises do tipo dose-resposta, empregando-se o um modelo Weibull do pacote “drc” (Analysis of Dose-Response Curves) (Ritz & Streibig, 2005) compilado pelo software R® (2009).

5 RESULTADOS

5.1 Composição química dos óleos essenciais

A composição das frações voláteis obtidas a partir dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Mentha piperita* durante a extração está representada na Tabela 1. Nas análises de GC-MS foram identificados oito compostos, que representaram 80,66% da composição total do óleo essencial de *C. citratus*; já para *M. piperita*, pelas análises de GC-MS, foram identificados dezenove compostos, que representaram 98,24% da composição total dos óleos. Esses óleos apresentaram, em sua composição, principalmente, monoterpenos como mentol, mentona, geranial e neral.

5.2 Formação do biofilme

O gráfico da figura 1 demonstra a formação de biofilme por *E. coli* em cupons de aço inoxidável imersos em TSB, a 35°C, por 10 dias. Uma suspensão com concentração inicial de células de 10^8 UFC/mL⁻¹ foi utilizada para simular uma alta contaminação microbiana.

A adesão na superfície dos cupons de aço inoxidável, após 48 horas de incubação, foi de 10^6 UFC/cm². Até as 144 horas de formação do biofilme, o número de células aderidas manteve-se semelhante ao valor inicial nas 48 horas de incubação. Entretanto, após as 144 horas, os valores alcançaram 10^7 UFC/cm² e se mantiveram constantes até as 240 horas de crescimento (Figura 1).

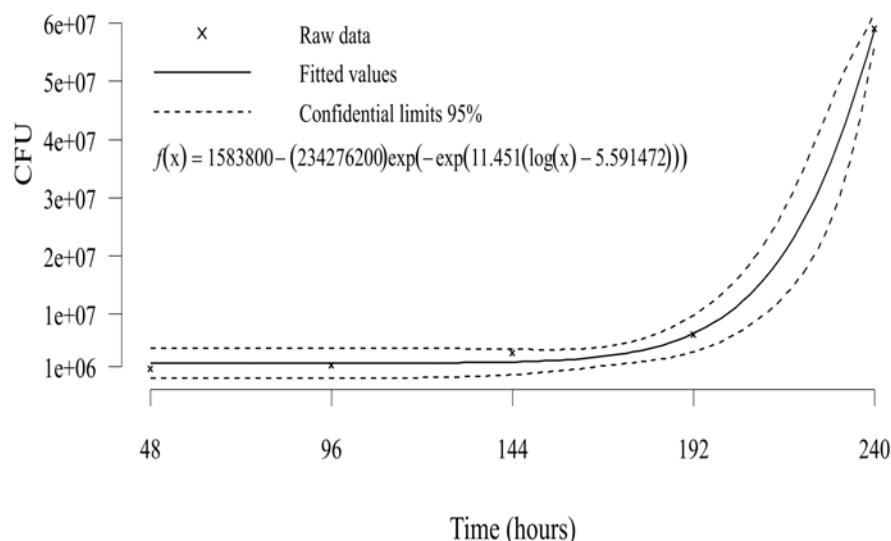


FIGURA 1 Quantificação do crescimento de *Escherichia coli* durante a formação de biofilme sobre aço inoxidável AISI 304 (#4), com incubação, a 35°C, em meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato.

5.3 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana de soluções à base de óleo essencial de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus* frente ao biofilme formado por *Escherichia coli* 184, em superfície de aço inoxidável, está sumarizada na Tabela 2.

A avaliação foi feita pela contagem obtida após o tratamento dos cupons que apresentaram a formação do biofilme por *E. coli*, com as soluções de óleo essencial por 10, 20 e 40 minutos de contato. O efeito de cada solução de óleo essencial frente o biofilme foi expresso como redução logarítmica da população bacteriana entre o biofilme formado inicialmente e as células remanescentes após o tratamento.

Com as soluções utilizadas a uma concentração de 7,8% (v/v) para ambos os óleos, observou-se que, após 10 minutos de contato, obtiveram-se quatro reduções logarítmicas para o óleo de *Cymbopogon citratus* e uma redução logarítmica para o óleo de *Mentha piperita*, a partir do número de células iniciais, que era de 10^7 UFC/ cm². Já após 20 e 40 minutos de contato, o tratamento resultou em uma redução logarítmica a níveis abaixo do limite detectável pelo método de contagem em placa, para ambos os óleos.

5. 4 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que as células sésseis de *E. coli* não tratadas com os óleos essenciais exibiram uma morfologia normal, com superfície celular lisa (Figura 2 A e E). A observação morfológica das células tratadas com os óleos essenciais de *C. citratus* e *M. piperita* demonstrou que houve alterações estruturais na superfície da célula, como depressões e aumento da rugosidade. Além disso, notaram-se também algumas células não divididas e certos alongamentos celulares.

TABELA 1 Percentual da composição dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e de *Mentha piperita*

<i>M. piperita</i>	%	<i>C. citratus</i>	%
componentes	GC-MS	componentes	GC-MS
Artemísia triene	0,32	metil-5-epten-2-one	0,43
Sabineno	0,12	mirceno	2,53
β -pineno	0,37	linalol	4,21
Mirceno	0,25	neral	31,12
Limoneno	0,94	geraniol	1,33
1,8-cineol	0,07	geranial	38,43
Isopulegol	0,68	ciperene	0,24
Mentona	10,95	2-undecanona	2,37
Iso-mentona	4,82		-
Mentol	68,21		-
Neiso-mentol	2,24		-
Pulegona	0,25		-
Piperitona	1,38		-
Acetato de neo-isopulegila	0,19		-
Acetato de neo-metila	0,12		-
Acetato de metila	6,65		-
Acetato de iso-metila	0,16		-
(E)-cariofileno	0,37		-
Germacreno D	0,15		-
Composição %	98,24		80,66

TABELA 2 Número de células de *Escherichia coli* aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC cm⁻², às 240 horas de formação de biofilme, após tratamento com óleo essencial.

Bactéria	Óleo essencial	UFC (±EP)		
		10 min	20 min	40 min
	Controle	5,87e ⁺⁷ ± 4,06e ⁺⁶		
<i>E. coli</i>	Capim	3.083,33± 90,98	0,00±0,00	0,00±0,00
	Hortelã	6.216,67± 293,73	0,00±0,00	0,00±0,00

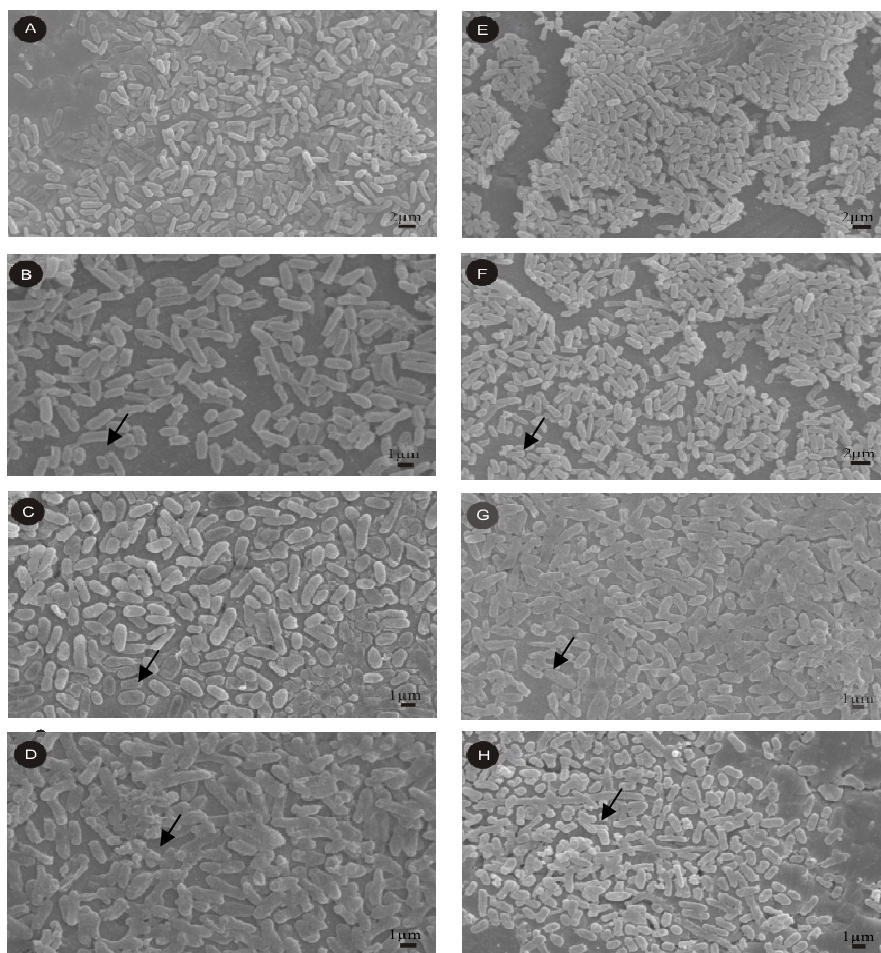


FIGURA 2 Eletromicrografia de vararredura do biofilme formado *E. coli* em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 240 horas de contato a 35°C, submetidas a soluções à base de óleo essencial. (A) controle, sem tratamento; (B) *C. citratus*, 10 minutos de tempo de contato; (C) *C. citratus*, 20 minutos de tempo de contato; (D) *C. citratus*, 40 minutos de tempo de contato; (E) controle, sem tratamento; (F) *M. piperita*, 10 minutos de tempo de contato; (G) *M. piperita*, 20 minutos de tempo de contato e (H) *M. piperita*, 40 minutos de tempo de contato.

6 DISCUSSÃO

Como demonstrado neste estudo, *E. coli* 184 foi capaz de aderir e formar biofilme em superfície de aço inoxidável, alcançando valores de 10^7 UFC.cm⁻², após 240 horas de incubação. A diferenciação entre adesão e biofilme tem sido proposta em função da quantidade de células presentes por cm². Zottola (1997) e Andrade et al. (1998) enfatizam que, para que se considere formação de biofilmes bacterianos, são necessárias contagens acima de 7 Log UFC.cm⁻². Assim, com base nestes autores, a contagem obtida é suficiente para considerar a existência de biofilme madura e não apenas adesão bacteriana.

Resultados semelhantes aos observados neste estudo foram obtidos por Ryu et al. (2004) que, ao avaliarem a formação de biofilme por três cepas de *E. coli* O157:H7 (43895+, 43894+ e E0018+) em cupons de aço inoxidável imersos em TSB, a 22°C, por 6 dias, observaram que a população de cepas inicialmente aderidas foi de 5,1; 5,5 e 5,6 log₁₀ UFC por cupom, respectivamente, aumentando para 7,9; 7,7 e 7,3 log₁₀ UFC por cupom, respectivamente, com dois dias, permanecendo constante durante o período restante de incubação.

Castonguay et al. (2006) afirmam que varias cepas de *E. coli* apresentam habilidade para aderir e formar biofilme, o que resulta em uma maior persistência no ambiente. As cepas de *E. coli* podem produzir uma variedade de diferentes determinantes para adesão e formação de biofilme em superfícies sólidas, tais como curli (uma estrutura proteica da superfície celular), pili tipo I, flagelos, pili conjugativo e polissacarídeos extracelulares.

Recentemente, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais vem sendo avaliada frente a biofilmes, visando a possível utilização desses compostos como agentes sanificantes na indústria de alimentos. Os resultados encontrados nos trabalhos já realizados têm sido promissores, entretanto, ainda divergem entre si,

demonstrando a necessidade de realização de mais estudos sobre o assunto (Chorianopoulos et al., 2008).

Neste estudo, a solução de óleo essencial à base de *C. citratus*, após 10 minutos de contato com os cupons que apresentaram a formação de biofilme, promoveu quatro reduções logarítmicas, enquanto a solução à base de *M. piperita* reduziu apenas 1 ciclo logarítmico após este mesmo tempo de contato.

Hammer et al. (1999) avaliaram a mínima concentração inibitória de *C. citratus* e observaram a inibição de *E. coli* a uma concentração de 0,06%, ao passo que a concentração inibitória de *M. piperita* foi de 0,5% (v/v).

A maior efetividade apresentada pela solução à base de óleo essencial de *C. citratus*, quando comparada à solução à base de óleo essencial de *M. piperita* após 10 minutos de contato (Tabela 2), pode ser atribuída, principalmente, à composição química distinta entre os óleos.

Os constituintes majoritários do óleo de *C. citratus*, os estereoisômeros geranial (38,43%) e neral (31,12%), são (não aromáticos) aldeídos monoterpênicos, enquanto os constituintes majoritários de *M. piperita*, o mentol (68,21%) e a mentona (10,95%), são (monocíclicos) álcool e cetona, respectivamente. Alguns autores têm relatado maior atividade em compostos fenólicos (Consentino et al., 1999; Dorman & Deans, 2000), seguidos por aldeídos, cetonas, álcoois e outros hidrocarbonetos (Özcan & Boyraz, 2000).

Com relação ao tempo de contato utilizado, observou-se que a ação das soluções à base de óleo essencial foi mais efetiva após 20 e 40 minutos de tratamento, quando se observou uma redução logarítmica a níveis abaixo do limite detectável pelo método de contagem em placa (Tabela 2). Nesta etapa, a efetividade da solução à base de óleo essencial de *M. piperita* não diferiu da efetividade da solução à base de óleo essencial de *C. citratus*.

Resultados semelhantes ao deste estudo foram obtidos por Oliveira et al. (2009) que, ao avaliarem a efetividade de solução sanitizante à base de óleo

essencial de *C. citratus* frente a biofilme formados em superfície de aço inoxidável por *Listeria monocytogenes*, durante 15 e 60 minutos de contato, observaram que a solução sanitizante foi mais efetiva após os 60 minutos de contato.

Como a ação antibacteriana dos óleos essenciais ocorre, principalmente, pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, com consequente extravasamento de conteúdo celular, observa-se que quanto maior o tempo de contato entre o microrganismo e a solução contendo óleo essencial, maior será a perda de constituintes intracelulares. Segundo Denyer & Hugo (1991), apesar de certa quantidade de extravasamento do conteúdo celular ser tolerada pelas bactérias sem perda da sua viabilidade, perda extensiva de conteúdo ou saída de moléculas essenciais e íons conduzirão à morte celular. Estas afirmações podem explicar a maior efetividade apresentada pelas soluções de óleo essencial após um maior tempo de contato com o biofilme.

Os óleos essenciais de *C. citratus* e *M. piperita* apresentaram monoterpenos, geranial, neral, linalol, mentol, mentona e iso-mentona como principais componentes. O mecanismo de ação dos monoterpenos não é completamente compreendido, porém, sabe-se que ele envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da célula (Sokmen et al., 2004), exercendo essa atividade por meio do rompimento da integridade da membrana das bactérias (Knobloch et al., 1989). Outra importante característica desta classe de compostos é sua hidrofobicidade, que lhes permite penetrar nos componentes lipídeos da mitocôndria e na membrana celular da bactéria, desorganizando a estrutura celular e conferindo a esta uma característica de permeabilidade, resultando em extravasamento de moléculas importantes do interior celular e eventual morte da bactéria (Sikkema et al., 1994).

A ação antibacteriana proposta para constituintes dos óleos essenciais presentes nas soluções à base de *C. citratus* e *M. piperita* pode ser visualizada

pela MEV. Nas células tratadas com os óleos essenciais, observaram-se distintas mudanças morfológicas, como a rugosidade e a deformidade das células sésseis de *E. coli* (Figura 2 B, C, G). Estas observações sugerem a ocorrência de depleção do conteúdo das células, indicando que a membrana celular foi afetada e danificada pelo agente antimicrobiano. Segundo Turgis et al. (2009), eletromicrografias das células tratadas com óleo essencial de mostarda demonstraram rompimento da membrana e danos na morfologia de *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella typhi*.

Os alongamentos celulares observados (Figura 2 D e H) sugerem que os óleos essenciais podem interferir na divisão das células bacterianas, levando à deformação da célula que apresenta, tipicamente, a forma de bastonete curto, para uma forma de bastonete longo não usual. Estudos anteriores sobre células vegetativas relatam que células se tornam alongadas e formam filamentos sob condições de estresse. Estudos de *Salmonella enteritidis* durante o congelamento (Phillips et al., 1998) e de *Listeria monocytogenes* exposta a altas concentrações de sal (Isom et al., 1995) revelaram que as células sob condições de estresse alongaram e formaram grandes filamentos.

Resultados semelhantes foram observados por Suwalak et al. (2009) que também observaram, a partir de MEV, mudanças morfológicas, tais como alongamento e rugosidade, nas células de *E. coli* O157:H7 tratadas com extrato etanólico de *Quercus infectoria*.

7 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, pode-se concluir que as soluções à base de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Mentha piperita*, na concentração de 7,8%, apresentam boa atividade antimicrobiana frente às células sésseis de *Escherichia coli*, sendo esta atividade mais efetiva após 20 minutos de tratamento.

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais ficou também evidente pelas mudanças morfológicas apresentadas pelas células tratadas, as quais foram observadas pela MEV.

Devido à atividade antibacteriana desses óleos essenciais e sua disponibilidade como produto natural, eles podem ser utilizados para aplicação como sanitizantes nas superfícies de equipamentos das indústrias de alimentos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. 479 p.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 11, p. 1454-1458, Nov. 1998.

BARNES, L. M.; LO, M. F.; ADAMS, M. R.; CHAMBERLAIN, A. H. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4543-4548, Oct. 1999.

CASTONGUAY, M. H.; SCHAAF, S. van der; KOESTER, W.; KROONEMANN, J.; MEER, W. van der; HARMSSEN, H.; LANDINI, P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 5, p. 471-478, June 2006.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. 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. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, Dec. 2008.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 130-135, Aug. 1999.

DENYER, S. P.; HUGO, W. B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: _____. **Mechanisms of action of chemical biocides**. Oxford: Oxford Blackwell Scientific, 1991. p. 171-188.

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

EFSTATHIOS, D.; NYCHAS, G. J. The adherence of Salmonella Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 8, p. 747-752, Dec. 2006.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 2007.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 985-990, June 1999.

ISOM, L. L.; KHAMBATTA, Z. S.; MOLUF, J. L.; AKERS, D. F.; MARTIN, S. E. Filament formation in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 9, p. 1031-1033, Sept. 1995.

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

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERI, B.; WEGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 1, n. 1, p. 119-128, Feb. 1989.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803, Feb. 2005.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSOS, 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, p. 549-553, Apr. 2009.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

OZCAN, M.; BOYRAZ, N. Antifungal properties of some herb decoctions. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 1, p. 86–88, Dec. 2000.

OZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 6, p. 658-660, June 2001.

PAWAR, D. M.; ROSSMAN, M. L.; CHEN, J. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 418-425, Aug. 2005.

PHILLIPS, L. E.; HUMPHREY, T. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Chilling invokes different morphologies in two *Salmonella* Enteritidis PT4 strains. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 5, p. 820-826, May 1998.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Chicago, v. 12, n. 5, p. 1-22, Jan. 2005.

RIVAS, L.; FEGAN, N.; DYKES, G. A. Attachment of shiga toxigenic *Escherichia coli* to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 89-94, Apr. 2007.

ROSSONI, A. B.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 81-85, Oct. 2000.

RYU, J. H.; KIM, H.; FRANK, J. F.; BEUCHAT, L. R. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 359-362, Oct. 2004.

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

SOKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M.; POLISSIOU, M.; TEPE, B. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 11, p. 3309-3312, 2004.

SUWALAK, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Morphological and ultrastructural changes in the cell structure of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 following treatment with *Quercus infectoria* nut galls. **Journal of Electron Microscopy**, Tokyo, v. 58, n. 5, p. 315-320, Oct. 2009.

TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 12, p. 1073-1079, Dec. 2009.

ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. (Ed.). **Food microbial analysis: new technologies**. New York: Marcell Dekker, 1997. cap. 16, p. 315-346.

CAPÍTULO 4

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Salmonella enteritidis* EM AÇO INOXIDÁVEL E AÇÃO SANIFICANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

1 RESUMO

Soluções à base de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) foram testadas em biofilme formado por *Salmonella enterica* Enteritidis S64, após 240 horas em aço inoxidável AISI 304 (#4). Os óleos essenciais testados na concentração de 7,8% apresentaram atividade antimicrobiana frente ao biofilme, após 20 minutos de contato, verificando redução de 100% no número de células viáveis do biofilme. A ação dos óleos essenciais pode ser observada por meio da microscopia eletrônica de varredura que demonstrou o rompimento da parede celular e alterações morfológicas das células tratadas com soluções de óleo essencial de *M. piperita* e *C. citratus*. Os óleos essenciais estudados podem ser considerados alternativas convenientes a aditivos químicos, para o uso na indústria de alimentos, atendendo às necessidades por qualidade e satisfazendo à demanda pelo consumo de produtos naturais.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, microscopia eletrônica de varredura.

2 ABSTRACT

Solutions based on essential oil of *Mentha piperita* and *Cymbopogon citratus* were tested in biofilm formed by *Salmonella enterica* Enteritidis S64, after 240h in stainless steel surface AISI 304 (#4). Essential oil (7,8%) presented antimicrobial activity against the biofilm, mainly after 20 min of contact. In this time was obtained reduction of 100% in the biofilm viable cells number. The essential oil action could be observed through SEM that showed a disruption of the cell wall and morphology alterations of cells treated with solutions of *M. piperita* and *C. citratus* essential oil. Essential oil studied in the present work can be considered as convenient alternatives to chemical additives to application in the food industry, addressing the needs for quality and consumer demand for natural products.

Key-word: Antimicrobial activity, *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, scanning electron microscopy.

3 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um dos mais importantes patógenos de origem alimentar, sendo responsável por mais de 95% dos casos de infecções alimentares e cerca de 30% das mortes provenientes de doenças originadas por alimentos (Hohmann, 2001). Vários estudos têm documentado a habilidade de *Salmonella* spp. em aderir e formar biofilme resiliente em superfícies e equipamentos como plástico, vidro e aço inoxidável, em ambientes de processamento de alimentos (Austin et al., 1998; Ortega et al., 2009)

A adesão bacteriana a diferentes superfícies na indústria de alimentos com subsequente desenvolvimento de biofilme tem grande relevância econômica e de saúde pública. Quando microrganismos patogênicos e ou deterioradores participam do processo de formação de biofilme, podem atuar como potencial fonte de contaminação de produtos alimentícios, o que leva à deterioração dos alimentos ou à transmissão de doenças (Stepanovic et al., 2003). A eliminação desse complexo usualmente requer o uso de detergentes ácidos ou alcalinos e ou iodóforos. Embora eficazes, questões como corrosão de materiais, contaminação de produtos e toxicidade, combinados com a rápida emergência de espécies microbianas resistentes, limitam o uso desses compostos. Tais problemas são agravados pela resistência apresentada pelas células sésseis ou em biofilme a antibióticos e biocidas, quando comparados com células planquitônicas (Hood & Zottola, 1995).

Devido, principalmente, à resistência apresentada por biofilmes a antisépticos convencionais e antibióticos, a demanda por novos antimicrobianos para o controle do mesmo tem aumentado. Com isso, atenções estão se voltando para o uso de compostos antimicrobianos naturais, o que estimulou algumas investigações com relação aos efeitos de fitoquímicos. Entre esses estudos, há

crescente pesquisa com relação aos óleos essenciais, que são metabólitos secundários voláteis, produzidos pelas plantas. Devido ao seu versátil conteúdo de compostos, variando desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre, estes têm demonstrado potencial para serem utilizados como agente antibacteriano e antifúngico (Burt, 2004).

Embora a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tenha sido relatada, as informações a respeito de seu uso como desinfetante ainda é limitada, sendo necessários mais estudos (Bakkali et al., 2008).

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) frente ao biofilme formado por *Salmonella enterica* Enteritidis S 64, em superfície de aço inoxidável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos usados, padronização, preparação e estocagem do inóculo

O microrganismo utilizado, *Salmonella enterica* Enteritidis S 64, proveniente da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ. Para padronização do número de células, as cepas foram inicialmente inoculadas em frasco Erlenmeyer contendo 150mL de caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®) e incubadas a 37°C. A curva de crescimento da bactéria foi determinada por leituras periódicas da absorbância a 600nm e diluições seriadas em solução salina [NaCl 0,9% 9p/v). Subsequentemente, realizou-se plaqueamento de 0,1 ml da diluição adequada em superfície para a determinação do Log UFC. mL⁻¹, em ágar triptona de soja (TSA) (Himedia®). Para o experimento, a cepa foi estocada sob refrigeração em meio de cultura de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15ml de glicerol; 0,5g de peptona bacteriológica; 0,3g de extrato de levedura; 0,5g de NaCl; pH 7,2±7,4).).

Para ativação e utilização da cepa, alíquota do meio de cultura de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos em TSB com incubação a 37°C, por 24 horas. Em seguida, a cultura foi estriada em placas contendo TSA e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, algumas foram removidas e transferidas para Erlenmeyer contendo 150 ml de TSB, os quais foram incubados a 37°C, até a obtenção do número de células necessárias para o experimento, aproximadamente 8 log UFC mL⁻¹ (OD_{600 nm} = 1.320).

4.2 Modelo experimental de formação do biofilme

O modelo experimental de formação do biofilme por *Salmonella* Enteritidis foi elaborado segundo sistema proposto por Gram et al. (2007) e em

suporte de aço inoxidável AISI 304 (#4), composto por duas divisões, cada qual dando lugar ao apoio de vinte cupons de aço inoxidável AISI 304 com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm, dispostos verticalmente. O conjunto suporte e cupons foi colocado em um béquer de 1.000 mL, o qual continha uma barra magnética e permaneceu acomodado sobre um agitador magnético, utilizado com a finalidade de permitir a livre circulação do substrato dentro do béquer, o qual foi lacrado com auxílio de placa de Petri e filme plástico.

4.3 Preparo dos cupons e suporte de aço inoxidável

Para iniciar o estágio de formação do biofilme, os cupons e o suporte de aço inoxidável foram previamente higienizados e esterilizados. Inicialmente, eles foram limpos com acetona 100%, lavados por imersão em detergente alcalino [NaOH 1% (p/v), pH 13,2) por 1 hora, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, eles foram lavados com água destilada estéril, secos por 2 horas 60°C e autoclavados a 121°C, por 15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

4.4 Formação do biofilme

O suporte de aço inoxidável contendo os cupons foi disposto no interior de um béquer de 1.000 mL, juntamente com uma barra magnética. Em seguida, foram adicionados ao béquer 900 mL de TSB previamente estéril e 1 mL de TSB contendo a cultura bacteriana, perfazendo a concentração final de, aproximadamente, 8 Log UFC.mL⁻¹. O béquer foi vedado e colocado a 37°C, sob agitação de 50 rpm. A cada 48 horas, os cupons foram removidos do suporte, lavados com tampão fosfato salino estéril (PBS, pH 7,4), removendo-se, assim, as células não aderidas. Após lavagem, os cupons foram novamente dispostos em um novo suporte estéril e imersos em um novo béquer contendo 900 mL de TSB, ambos esterilizados. Esse procedimento foi repetido por cinco

vezes, visando à completa formação de biofilme após incubação (Joseph et al., 2001).

4.5 Materiais vegetais

Os materiais vegetais utilizados para a extração de óleo essencial foram folhas secas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*). O material foi colhido no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizado na cidade de Lavras, região sul de Minas Gerais (Brasil), a 21°14'S, longitude 45°00' W GR e 918 m de altitude. As plantas foram coletadas em novembro de 2008, na parte da manhã, em dia de temperatura amena e sem precipitação pluviométrica.

4.6 Extração dos óleos essenciais

O método empregado para a extração dos óleos essenciais foi o de hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado. O processo de extração foi realizado por 2 horas, controlando-se a temperatura em, aproximadamente, 100°C.

4.7 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

As análises qualitativas dos óleos foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), utilizando-se aparelho Shimadzu CG-17^a, com detector seletivo de massa modelo QP 5050A sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25mm) com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280°C; programação da coluna com temperatura inicial de 50°, por 2 minutos com aumento de 4°C/minuto, até 200°C; depois, 10°C/minuto até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos. Utilizou-se, como gás carreador, hélio (1mL min⁻¹); a pressão inicial na coluna foi de 100,2 KPa; a taxa

split de 1:83 e o volume injetado de 0,5 μ m (1% de solução em diclorometano). As condições para espectrômetro de massas (EM) foram: energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição 1000, intervalo de decomposição de 0,50 e fragmentos de 40 Da e 550Da decompostos. Foi injetado nas mesmas condições das amostras, uma série de padrões de hidrocarbonetos (C₉H₂₀.....C₂₆H₅₄). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e pelo índice de Kovat, calculando para cada constituinte, de acordo com Adams (1995).

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa. Nesta análise, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG - 17 A, com detector por ionização de chama (FID), nas seguintes condições cromatográficas: coluna capilar (DB5); programação da coluna com temperatura inicial de 50°C, por 2 minutos, com aumento de 4°C/minuto até 200°C; depois, 10°C/minuto até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C por 10 minutos. Utilizou-se como gás carreador o nitrogênio (2,2 mL.min⁻¹); a taxa de split foi de 1:10 eo volume injetado, de 1 mL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

4.8 Determinação da atividade antimicrobiana

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar, de acordo com Mendonça (2004), com modificações. Como meio de cultura utilizou-se TSA. Para o preparo das cavidades de deposição dos óleos essenciais, uma camada inicial do meio de cultura foi depositada em placas de Petri, sobre as quais, após solidificação, foram dispostas pérolas de vidro. Uma sobrecamada do meio de cultura contendo o inócuo na concentração de, aproximadamente, 8 Log UFC. mL⁻¹ foi depositada sobre as pérolas de vidro dispostas na superfície da camada inicial. Após solidificação da sobrecamada, as pérolas de vidro foram removidas

com o auxílio de pinças estéreis, dando origem às cavidades. Em seguida, 10µl das diferentes concentrações (0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50), expressas em porcentagem (v/v) dos óleos essenciais de *M. piperita* e *C. citratus*, foram diluídos em etanol e transferidos para as cavidades. A concentração 0% (v/v), constituída apenas de etanol, foi utilizada como controle positivo do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas, a 37°C, por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. A atividade antibacteriana foi caracterizada pelo comprometimento do crescimento bacteriano, observado pela formação de halo de inibição. A menor concentração que apresentou atividade antimicrobiana foi definida como concentração mínima inibitória (CMI).

4.9 Tratamento dos cupons com óleos essenciais

Após 240 horas de formação de biofilme, os cupons de aço inoxidável foram submetidos a tratamentos com óleos essenciais de hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) e de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Os cupons de aço inoxidável foram removidos do suporte e mergulhados três vezes em solução salina, removendo-se, assim, as células não aderidas. Em seguida, foram imersos em soluções alcoólicas de 2 mL de óleos essenciais em concentração de 7,8% (v/v) e solução controle (álcool etílico PA), durante 10, 20 e 40 minutos, em temperatura ambiente, sob condições estáticas.

4.10 Enumeração das células do biofilme

O número de bactérias foi definido pela contagem padrão em placas durante a formação do biofilme (48, 96, 144, 192 e 240 horas) e após o tratamento com os óleos essenciais (240 horas). Foram retirados, aleatoriamente, dois cupons de aço inoxidável com pinça esterilizada, os quais foram imersos separadamente em 10 mL de água peptonada a 0,1%, por 1 minuto, para a

remoção das células não aderidas. Em seguida, as sésseis foram removidas utilizando-se *swabs* estéreis. Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (p/v) e agitados em vórtex, por 2 minutos. Diluições de até 10^{-10} foram preparadas e alíquotas de 100µL foram inoculadas na superfície de placas de Petri contendo TSA. As placas foram incubadas a 35°C, por 24 horas e foi determinado o número de células viáveis em UFC. cm⁻².

4.11 Microscopia eletrônica de varredura

Um cupom de cada cultura bacteriana contendo células aderidas, com tratamento e sem tratamento com óleos essenciais, foi tratado com fixador Karnovsky modificado (pH 7,2) por um período de 15 dias. Em seguida, foi lavado com tampão cacodilato três vezes, por 10 minutos e tratadas com tetróxido de ósmio por 4 horas, sendo este retirado com água destilada (três lavagens). Posteriormente, realizou-se a desidratação do material em acetona usando séries de 25% , 50%, 75%, 90% (uma vez de 10 minutos) e 100% (três vezes por 10 minutos cada). Após as etapas descritas anteriormente, as amostras foram acondicionadas em porta-amostras e levadas para secagem em secador de ponto crítico e, posteriormente, montadas em stubs com fita dupla face de carbono e levadas ao *sputtering* para metalização com ouro. Realizada a metalização, as amostras foram visualizadas e imagens digitais foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura MEV LEO Evo 40.

4. 12 Análise estatística

Os dados de crescimento de *Salmonella* Enteritidis obtidos foram submetidos a análises do tipo dose-resposta, empregando-se o modelo de Weibull com quatro parâmetros do pacote “drc” (Analysis of Dose-Response Curves) (Ritz & Streibig, 2005) compilado pelo software R[®] (2009)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Salmonella Enteritidis aderiu ao aço inoxidável, alcançando valores de 10^6 UFC/ cm², após 48 horas de incubação (Figura 1), com um inóculo inicial de 10^8 UFC/mL⁻¹, o que caracteriza alta quantidade de células aderidas. Segundo Zottola (1997), esse número de células é suficiente para considerar a existência de biofilme maduro e não apenas adesão bacteriana.

Resultados semelhantes foram relatados por Joseph et al. (2001) que, ao estudarem duas culturas de *Salmonella* isoladas de frango (*Salmonella weltevreden* e *Salmonella* FCM40), observaram uma densidade populacional de 10^6 CFU. cm⁻² para ambas as culturas, após 48 horas de contato com aço inoxidável. Segundo estes autores, muitas vezes o tempo de contato entre alimentos e superfícies de processamento pode ser de 24-48 horas, dependendo das condições de processamento, do tipo de equipamentos e das condições de limpeza e sanitização. Uma vez o biofilme formado, este pode ser fonte de contaminação para outros alimentos que passam pela mesma linha de processamento.

Até 192 horas de formação do biofilme, o número de células aderidas manteve-se semelhante ao valor inicial, observado às 48 horas de incubação. Entretanto, após 192 horas de crescimento, os valores alcançaram 10^7 CFU. cm⁻², se mantendo constantes até às 240 horas de crescimento (Figura 1). Giaouris & Nychas et al. (2006) demonstraram, em seus estudos, que quando os cupons de aço inoxidável foram totalmente cobertos pelo meio de crescimento e reabastecidos com meio fresco, o biofilme alcançou uma densidade populacional máxima de 10^7 UFC/ cm⁻², após 15 dias de crescimento.

A formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis em superfícies inerte é complexo, pois envolve a interação de vários componentes da superfície celular bacteriana, expressos pela célula em determinado ambiente e a natureza

das moléculas solventes adsorvidas à superfície e propriedades da própria superfície inerte (Austin et al., 1998; Donlan & Costerton, 2002).

O aço inoxidável é uma das superfícies mais utilizadas no processamento de alimentos e mostra-se liso a olho nu. Entretanto, quando visualizado em microscópio eletrônico, apresenta várias irregularidades. O aço inoxidável utilizado neste estudo (AISI 304 #4) é moderadamente irregular, quando comparado aos demais tipos e tem falhas distintas. As irregularidades apresentadas pelas superfícies utilizadas na indústria de alimentos têm importante papel na formação de biofilme (Bower et al., 1996). A ocorrência dessas imperfeições, além de proteger as células bacterianas contra forças exercidas pelo fluxo do alimento, origina regiões de difícil acesso que podem reduzir a eficiência de procedimentos de higienização, favorecendo o crescimento microbiano e o desenvolvimento de biofilmes (Zottola & Sasahara, 1994; Chia et al., 2009).

Quando células bacterianas aderem a superfícies e formam biofilmes, a limpeza e a sanificação, normalmente, tornam-se mais difíceis. Possíveis razões para o aumento da resistência de células em biofilmes ao tratamento antimicrobiano incluem a dificuldade de os sanificantes penetrar na matriz que envolve o biofilme, o microambiente alterado que contribui para reduzir a velocidade de crescimento microbiano, a aquisição de fenótipos de resistência e a existência de células persistentes (Gilbert et al., 2001; Gawande & Bhagwat 2002; Chorianopoulos et al., 2008). Estes fatores dificultam a eliminação de biofilmes, sendo importante o desenvolvimento de novas estratégias de limpeza e sanificação para o controle de *Salmonella* sp. em ambientes de processamento de alimentos.

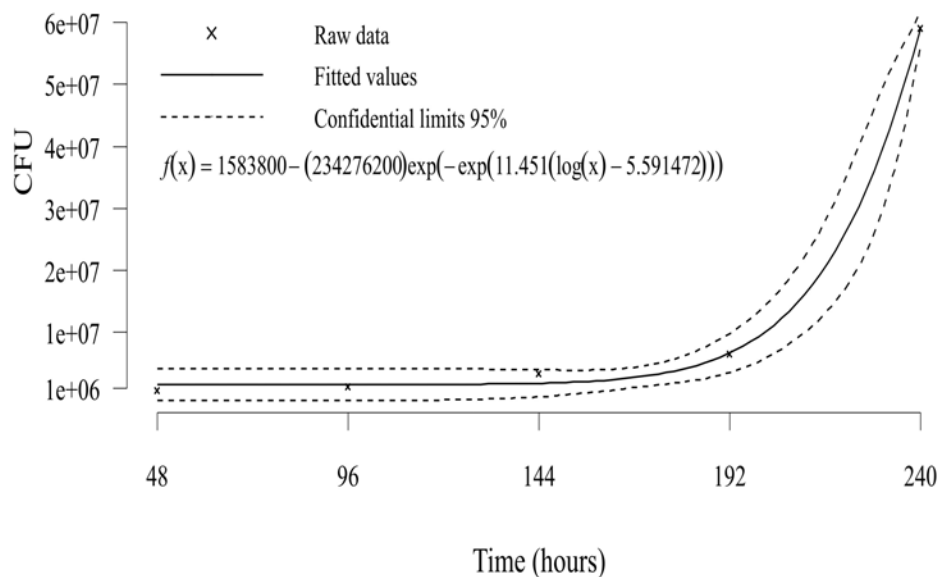


FIGURA 1 Quantificação do crescimento de *Salmonella* Enteritidis durante a formação de biofilme sobre aço inoxidável AISI 304 (#4), com incubação a 37°C, em meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato.

A atividade antibacteriana de soluções à base de óleo essencial de *Mentha piperita* e *Cymbopogon citratus* foi avaliada pela contagem obtida após o tratamento dos cupons de aço inoxidável que apresentavam formação de biofilme por *Salmonella* Enteritidis após 240 horas de incubação. Dessa forma, o efeito de cada solução de óleo essencial sobre biofilme foi expresso como a redução logarítmica da população bacteriana entre o biofilme formado inicialmente e as células remanescentes após o tratamento.

De acordo com os resultados observados, verifica-se que os óleos essenciais de *M. piperita* e *C. citratus*, na concentração de 7,8% v/v, demonstraram capacidade de reduzir o número de células viáveis do biofilme formado por *Salmonella* Enteritidis. A efetividade da solução de óleo essencial

de *M. piperita* não diferiu da efetividade da solução à base de *C. citratus*. Após 10 minutos de contato entre as soluções e os cupons, observaram-se quatro reduções logarítmicas. Ambos os tratamentos resultaram em reduções logarítmicas a níveis abaixo do limite detectável pelo método de contagem em placa, quando o tempo de contato foi de 20 e 40 minutos (Tabela 1).

Alguns estudos têm mostrado resultados semelhantes a respeito da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a biofilme. Chorianopoulos et al. (2008) testaram dois sanificantes químicos ácidos (ácido láctico e ácido hidrocloreico), um sanificante alcalino (hidróxido de sódio) e óleo essencial de *S. thymbra*, frente a biofilme formado por *Salmonella entérica* e demonstraram que o óleo essencial exibiu forte atividade antimicrobiana frente ao biofilme, promovendo redução de 4 Log, enquanto a eficiência dos outros três desinfetantes não foi adequada, apesar do longo tempo de tratamento aplicado (180 min.).

Segundo Oliveira et al. (2009), soluções desinfetantes à base de óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, testados contra biofilme formado por *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável, foram capazes de reduzir em 100% o número de células, após 60 minutos de contato.

Afirmações a respeito do mecanismo de ação dos óleos essenciais têm sido baseadas na natureza de seus componentes. Contudo, a composição dos óleos essenciais pode variar amplamente, dependendo da região geográfica, da variedade, da idade da planta, do método de secagem e do método de extração do óleo.

A atividade antibacteriana de *C. citratus* e *M. piperita* tem sido relatada por alguns autores (Tassou et al., 2000; Iscan et al., 2002; Mayaud et al., 2008; Trajano & Lima, 2009).

Em alguns trabalhos tem sido relatado que há uma relação entre a composição química e a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Deans & Sbodova, 1990; Hayouni et al., 2008). Assim, neste trabalho, a atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais de *M. piperita* e *C. citratus* pode estar associada à presença de monoterpenos em sua composição.

O caráter lipofílico dos monoterpenos é o principal responsável pela sua atividade antimicrobiana (Sikkema et al., 1994; Burt 2004; Trombeta, 2005). Devido ao caráter hidrofóbico, ocorre acúmulo desses compostos na membrana citoplasmática, o que leva ao aumento da área superficial e à consequente expansão, causando aumento na fluidez, afetando, assim, a permeabilidade da célula e promovendo a liberação de constituintes extracelulares. Todavia, estes compostos também podem interferir em funções da membrana citoplasmática, como transporte de elétrons, absorção de nutrientes, proteínas de membrana, síntese de ácidos graxos e atividade enzimática (Sikkema et al., 1994; Viuda-Martos et al., 2008).

TABELA 1 Número de células de *Salmonella* Enteritidis aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC cm⁻², após 240 horas de formação de biofilme, após tratamento com óleo essencial.

Bactéria	Óleo essencial	UFC (±EP)		
		10 min	20 min	40 min
	Controle		5,9e ⁺⁷ ±3,31 e ⁺⁶	
<i>Salmonella</i> <i>sp.</i>	Capim	3.700,00± 309,84	0,00±0,00	0,00±0,00
	Hortelã	5.500,00± 453,14	0,00±0,00	0,00±0,00

A morfologia das células foi visualizada por MEV. As células sésseis de *Salmonella* Enteritidis não tratadas com os óleos essenciais exibiram uma morfologia celular normal com uma superfície celular lisa (Figura 2 A e B).

As células tratadas com soluções de óleo essencial de *M. piperita* e *C. citratus* demonstram o rompimento da parede celular e a morfologia alterada em relação ao controle (Figura 4 A, B, C e D). Estas observações sugerem que os óleos essenciais induziram a depleção do conteúdo celular de *S. Enteritidis*, uma vez que a estrutura da parede celular das bactérias foi severamente afetada e danificada, ocasionando um aumento na rugosidade da superfície celular. Os danos causados na membrana citoplasmática pela ação dos óleos essenciais podem ser também observados pela formação de bolhas na superfícies das células (Figura 4 A e B). Codling et al. (2005) demonstraram que PQ-1 e MAPD biocidas comerciais utilizados na desinfecção de lentes induzem danos na membrana citoplasmática de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*, sendo esta ação exemplificada pela formação de bolhas na superfície das células.

Foi possível observar também alterações morfológicas, como alongamentos (Figura 3 D), sugerindo que os óleos essenciais podem interferir na divisão das células bacterianas. Alongamento e formação de filamentos têm sido relatados em bactérias, incluindo *Escherichia coli* (Wainwright et al., 1999), *Listeria monocytogenes* (Isom et al., 1995), *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Shi & Xia, 2003) e *Salmonella* spp. (Phillips et al., 1998; Mattick et al., 2000) expostas a condições de estresse. Segundo Phillips et al. (1998), a formação de alongamento em *Salmonella* Enteritidis foi observada ao estudar o efeito do congelamento sobre as células. Essa mudança na morfologia confirma a ação dos óleos essenciais nas células bacterianas, causando danos estruturais e funcionais na membrana plasmática, modificando sua permeabilidade e levando ao extravasamento do conteúdo celular.

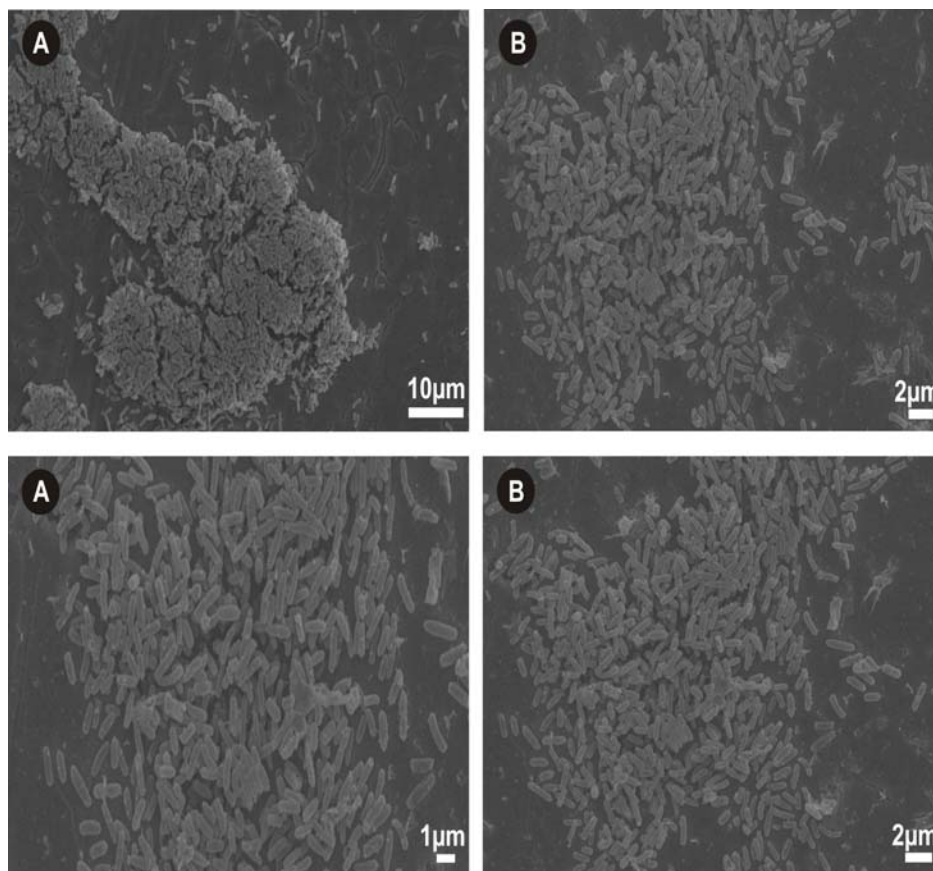


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de células de *Salmonella* Enteritidis aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304(# 4), após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato sem solução de óleo essencial.

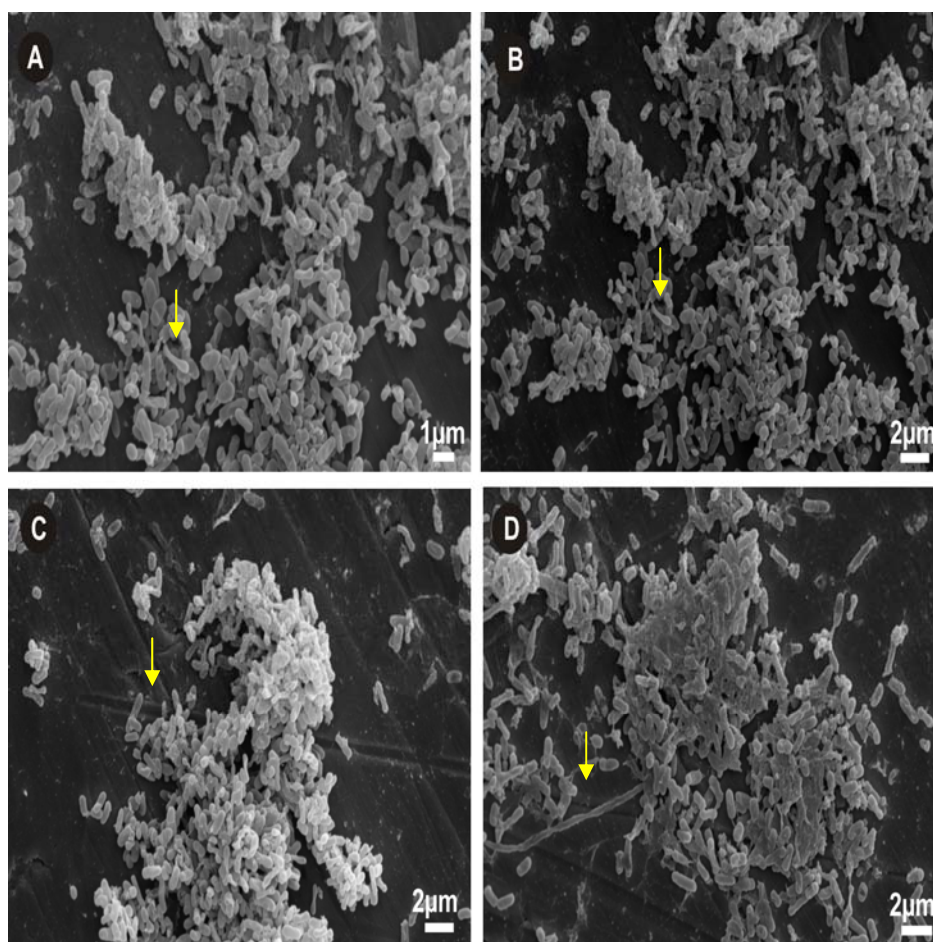


FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura de células de *Salmonella* Enteritidis aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304(# 4) após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas a soluções de óleo essencial de *M. piperita* (A) e (B) 10 minutos de tempo de contato; (C) 20 minutos de tempo de contato e (D) 40 minutos de contato.

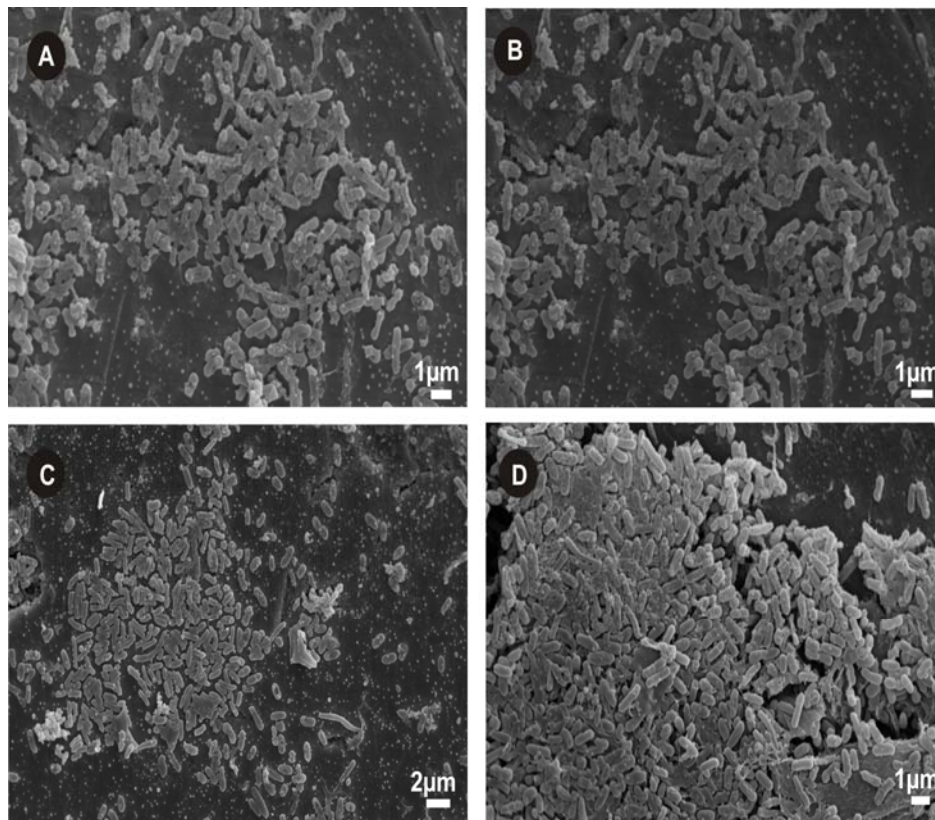


FIGURA 4 Eletromicrografia de varredura de células de *Salmonella* Enteritidis aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304(# 4), após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas a soluções de óleo essencial de *C. citratus*. (A) e (B) 10 minutos de tempo de contato; (C) 20 minutos de tempo de contato e (D) 40 minutos de contato.

6 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *M. piperita* e *C. citratus* demonstraram atividade antibacteriana frente a biofilmes formados em cupons de aço inoxidável por *Salmonella* Enteritidis. A ação dos óleos essenciais foi mais efetiva após 20 minutos de contato.

Os óleos essenciais de *M. piperita* e *C. citratus* podem ser considerados alternativas convenientes a aditivos químicos para o uso na indústria de alimentos, atendendo às necessidades por qualidade e satisfazendo à demanda pelo consumo de produtos naturais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. 479 p.

ANDRADE, N. J.; AJAO, D. B.; ZOTTOLA, E. A. Growth and adherence on stainless steel by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 11, p. 1454-1458, Nov. 1998.

AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KAY, W. W.; COLLINSON, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 295-301, May 1998.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Sept. 2008.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 152-157, May 1996.

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

CHIA, T. W. R.; GOULTER, R. M.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 8, p. 853-859, Dec. 2009. doi: 10.1016/j.fm.2009.05.012.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. 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. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, Dec. 2008.

CODLING, C. E.; HANN, A. C.; MAILLARD, J. Y.; RUSSELL, A. D. An investigation into the antimicrobial mechanisms of action of two contact lens biocides using electron microscopy. **Contact Lens and Anterior Eye**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 163-168, Dec. 2005.

DEANS, S. G.; SVOBODA, K. P. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 5, n. 3, p. 187-190, Sept. 1990.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 167-193, Apr. 2002.

GAWANDE, P. V.; BHAGWAT, A. A. Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 86-92, Jan. 2002.

GILBERT, P.; DAS, J. R.; JONES, M. V.; ALLISON, D. G. Assessment of resistance towards biocides following the attachment of microorganisms to, and growth on, surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 2, p. 248-254, Aug. 2001.

GIAOURIS, E. D.; NYCHAS, G. E. The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 8, p. 747-752, Dec. 2006.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 2007.

HAYOUNI, E. A.; CHRAIEF, I.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; LEVEAU, J. Y.; MOHAMMED, H.; HAMDI, M. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 125, n. 3, p. 242-251, July 2008.

HOHMANN, E. L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 263-269, Jan. 2001.

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

ISCAN, G.; KIRIMER, N.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CANBASER, K.; DEMIRCI, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, July 2002.

ISOM, L. L.; KHAMBATTA, Z. S.; MOLUF, J. L.; AKERS, D. F.; MARTIN, S. E. Filament formation in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 9, p. 1031-1033, Sept. 1995.

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

MATTICK, K. L.; JØRGENSEN, F.; LEGAN, J. D.; COLE, M. B.; PORTER, J.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; HUMPHREY, T. J. Survival and Filamentation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium DT104 at Low water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1274-1279, Apr. 2000.

MAYAUD, L.; CARRICAJÓ, A.; ZHIRI, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 167-173, Sept. 2008.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSOS, 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, p. 549-553, Apr. 2009.

ORTEGA, M. B.; HAGIWARA, T.; WATANABE, H.; SAKYUAMA, T. Adhesión behavior and removability of *Escherichia coli* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 573-578, Apr. 2009. doi:10.1016/j.foodcont.2009.08010.

PHILLIPS, L. E.; HUMPHREY, T. J.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Chilling invokes different morphologies in two *Salmonella* Enteritidis PT4 strains. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 5, p. 820-826, May 1998.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, Chicago, v. 12, n. 5, p. 1-22, Jan. 2005.

ROSSONI, A. B.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 81-85, Oct. 2000.

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

STEPANOVIĆ, S.; CIRCOVIĆ, L.; MIJAČ, V.; ŠVABIC-VLAHOVIĆ, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 339-343, June 2003.

TASSOU, C. C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 3/4, p. 273-280, Apr. 2000.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O. Propriedades antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre actérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, set. 2009.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTAI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, June 2005.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1130-1138, Dec. 2008.

WAINWRIGHT, M.; CANHAN, L. T.; AL-WAJEEH, K.; REEVES, C. L. Morphological changes (including filamentation) in *Escherichia coli* grown under starvation conditions on silicon wafers and other surfaces. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 224-227, Oct. 1999.

ZOTTOLA, E. A. Special techniques for studying microbial biofilms in food system. In: TORTORELLO, M. L.; GENDEL, S. M. (Ed.). **Food microbial analysis: new technologies**. New York: Marcell Dekker, 1997. cap. 16, p. 315-346.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food industry: should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 125-148, Oct. 1994.