



MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE
BIOFILMES BACTERIANOS: *Listeria*
monocytogenes E *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENICA**

LAVRAS – MG

2011

MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA

**ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE BIOFILMES
BACTERIANOS: *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli*
ENTEROPATOGÊNICA**

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

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS – MG

2011

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

Oliveira, Máira Maciel Mattos de.

Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos : *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica / Máira Maciel Mattos de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2011.

138 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Aço inoxidável. 2. Sanitizantes naturais. 3. Adesão bacteriana.
4. Bactérias patogênicas. 5. Laticínio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.1277

MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA

ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE BIOFILMES

BACTERIANOS: *Listeria monocytogenes* E *Escherichia coli*
ENTEROPATOGÊNICA

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

APROVADA em 18 de Novembro de 2011.

Prof. Dr. Alexandre Tourino Mendonça UNINCOR

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias UFLA

Prof. Dr. Roberto Maciel de Oliveira UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

LAVRAS – MG

2011

DEDICO

À minha mãe Beth, minha melhor amiga.

Ao Danilo, meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presença constante, a quem agradeço pelos momentos de felicidade, que foram como estímulos, para seguir em frente e pelos momentos difíceis e de tristeza, que serviram de grande aprendizado.

À minha mãe Beth que, mesmo distante, sempre participou ativamente desta etapa da minha vida. Obrigada por toda força, apoio, conversas e por me escutar nos momentos difíceis. Te amo!

Ao meu “namorado” Danilo, pelas ajudas no laboratório, realização da análise estatística, conversas e conselhos e por sempre me apoiar nos bons e maus momentos. Viver ao seu lado é muito importante. Te amo!

À minha orientadora, Profa. Roberta, pela orientação, durante todos estes anos, oportunidades, ensinamentos, atenção, confiança e amizade.

Aos membros da banca avaliadora, Prof. Alexandre, Prof. Disney, Prof. Roberto e Profa. Rosane, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

À Josianne e à Nádia, pela ajuda, durante o experimento, e amizade. Obrigada por tudo, meninas, vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho!

Aos meus familiares que, mesmo distantes, sempre torceram pelo sucesso deste trabalho, meu tio Ulysses, minha vó Maria Luíza, minha tia Analice, meu pai Hercílio e meu tio Cilo.

À minha segunda família, minha sogra Isabel, minha cunhada Michelle e meu sogro Florisvaldo, pelo apoio.

Ao Django, por sempre me esperar em casa alegre e disposto, tornando ainda mais feliz a minha vida.

Aos amigos e colegas da pós-graduação e do laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial à Natália, Aline, Letícia, Tenille, Heloísa, Glécia, Alcilene, Silvia, Alessandra Millezi e Nayane.

Aos funcionários do DCA, em especial à Eliane, pela ajuda, momentos de descontração e cafezinhos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

RESUMO

Biofilmes são comunidades microbianas que representam riscos à qualidade microbiológica dos alimentos, uma vez que células sésseis podem se desprender e contaminar produtos durante o processamento. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Listeria monocytogenes* merecem destaque dentre as bactérias envolvidas. EPEC é um dos principais agentes causadores da diarreia infantil, enquanto *L. monocytogenes* é responsável pela listeriose, infecção que, na forma invasiva, apresenta alta taxa de mortalidade. Visando eliminar riscos à saúde dos consumidores, novas alternativas ao procedimento de higienização convencional vêm sendo desenvolvidas. Dentre elas encontram-se a utilização de óleos essenciais (OE), metabólitos secundários vegetais com amplo espectro de ação antimicrobiana. Na primeira etapa deste estudo foi avaliada a atividade antibacteriana dos OEs das folhas de *Melaleuca alternifolia* (melaleuca) e *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão da Índia Oriental), e da casca de *Cinnamomum cassia* (canela da China), utilizados sozinhos e em combinação, sobre células planctônicas e sésseis de EPEC e *L. monocytogenes*. Após a realização de um *screening*, foram determinadas as Concentrações Mínimas Inibitórias sobre células planctônicas e avaliada a ação de diferentes concentrações sobre células aderidas em microplacas de poliestireno. O OE de *C. cassia* destacou-se e foi selecionado para a elaboração de soluções a serem utilizadas no controle de biofilmes formados em cupons de aço inoxidável. O OE de *C. cassia* (2,0% v/v por 20 minutos) foi capaz de eliminar totalmente as células viáveis do biofilme de ambas as espécies bacterianas formado em condições estáticas sobre cupons de aço inoxidável. Procedeu-se à segunda etapa, onde o OE de *C. cassia* e seu constituinte majoritário cinamaldeído foram testados, em diferentes concentrações (0-1,0% v/v de OE e 0-0,8% v/v de cinamaldeído) e tempos de contato (1-21 minutos), sobre biofilmes monoespécie e multiespécie de EPEC e *L. monocytogenes*. Estes ensaios foram realizados em aço inoxidável e na presença de leite integral, simulando elevado conteúdo de matéria orgânica. Foi possível obter combinações de tempo de contato e concentração capazes de eliminar as células viáveis do biofilme monoespécie de EPEC e do biofilme multiespécie de ambas as bactérias. A ação dos compostos testados foi, na maioria dos casos, superior ou equivalente a de sanitizantes químicos comerciais (cloreto de alquil dimetil benzil amônio, hipoclorito de sódio e peróxido de hidrogênio). O OE de *C. cassia* e o cinamaldeído são opções promissoras para elaboração de sanitizantes naturais a serem utilizados em indústrias de alimentos, principalmente, em laticínios.

Palavras-Chave: Aço inoxidável. Adesão bacteriana. Bactérias Patogênicas. *Cinnamomum cassia*. Cinamaldeído. Sanitizantes naturais.

ABSTRACT

Biofilms are microbial communities that represent risks to the microbiological quality of foods, as sessile cells can detach and contaminate products during processing. Among the bacterial species involved, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* should be highlighted. EPEC is a major causative agent of infantile diarrhea, while *L. monocytogenes* is responsible for listeriosis, an infection that in the invasive form presents a high mortality rate. With the intention of eliminate risks to consumer health, new alternatives to conventional hygienization procedure have been developed. Among them is the use of essential oils (EO), plant secondary metabolites with broad-spectrum antimicrobial activity. In the first stage of this study was evaluated the antibacterial activity of EOs from the leaves of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass), and from the bark of *Cinnamomum cassia* (Chinese cinnamon), used alone and in combination, against planktonic and sessile cells of EPEC and *L. monocytogenes*. After conducting a screening, were determined the Minimal Inhibitory Concentrations against planktonic cells and evaluated the action of different concentrations against cells adhered to polystyrene microplates. *C. cassia* EO stood out and was selected for the preparation of solutions to be used in the control of biofilms formed on stainless steel coupons. *C. cassia* EO (2.0% v/v for 20 minutes) was able to totally eliminate the biofilm viable cells of both bacterial species formed under static conditions on stainless steel coupons. In the second stage of this study the EO of *C. cassia* and its major constituent cinnamaldehyde were tested at different concentrations (0-1.0% v/v of EO and 0-0.8% v/v of cinnamaldehyde) and contact times (1-21 minutes) on single- and mixed-species biofilms of EPEC and *L. monocytogenes*. These tests were conducted using stainless steel coupons surface and in the presence of whole milk, simulating a high content of organic matter. It was possible to get combinations of contact time and concentration that can eliminated the viable cells of the single-species biofilm of EPEC and of the mixed-species biofilm of both bacteria. The action of the compounds tested was, in most cases, greater than or equal to that of commercial chemical sanitizers (alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, sodium hypochlorite and hydrogen peroxide). *C. cassia* EO and cinnamaldehyde are promising options for the development of natural sanitizers to be used in food industries, especially in dairy factories.

Keywords: Stainless steel. Bacterial adhesion. Pathogenic bacteria. *Cinnamomum cassia*. Cinnamaldehyde. Natural sanitizers.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	11
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Biofilmes bacterianos: definição, estrutura e composição.....	15
2.2	Formação de biofilmes bacterianos.....	17
2.3	Biofilmes bacterianos na indústria de leite e produtos lácteos...	23
2.4	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica.....	27
2.5	<i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.6	Higienização na indústria de leite e produtos lácteos.....	35
2.7	Óleos essenciais e seus constituintes: novas alternativas para o controle de biofilmes bacterianos.....	39
2.8	Espécies vegetais produtoras de óleos essenciais.....	44
2.8.1	<i>Melaleuca alternifolia</i> Cheel (melaleuca, árvore de chá ou <i>tea tree</i>).....	44
2.8.2	<i>Cymbopogon flexuosus</i> (D. C.) Stapf. (capim-limão da Índia Oriental).....	47
2.8.3	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume (canela da China).....	50
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	80
	ARTIGO 1 Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils.....	81
	ARTIGO 2 Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces..	107
	RESULTADOS OBTIDOS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	138

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana séssil, caracterizada pela adesão de microrganismos a superfícies sólidas, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Atualmente, mais de 60 anos após o primeiro relato a respeito de biofilmes microbianos (ZOBELL, 1943), verifica-se que estas complexas comunidades constituem-se no modo prevalente de vida dos microrganismos na natureza (KIM; FRANK, 1995; NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007; WATNICK; KOLTER, 2000) e são, ainda, motivo de preocupação em diversas áreas, principalmente, médica e de alimentos (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997; MAUKONEN et al., 2003; SIHORKAR; VYAS, 2001; VERAN, 2002).

No que diz respeito, especificamente, às indústrias de alimentos, destaca-se a formação de biofilmes em plantas de processamento de leite e derivados como problema significativo. Quando ocorre contaminação de produtos lácteos, biofilmes microbianos são, geralmente, um dos principais responsáveis. Este fato é ainda mais alarmante visto que grande número de estudos têm indicado a persistência de patógenos de origem alimentar em superfícies que entram em contato com alimentos, o que afeta a segurança dos produtos alimentícios (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Dentre os diversos microrganismos patogênicos, capazes de contaminar o leite e seus derivados, encontram-se *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC, do inglês *enteropathogenic E. coli*) e *Listeria monocytogenes*. A presença destas bactérias já foi verificada em diversos produtos, como leite cru (ALTALHI;

HASSAN, 2009; KALOREY et al., 2008; VANEGAS et al., 2009; WEIQIN et al., 2009), leite pasteurizado (CATÃO; CEBALLOS, 2001; SILVA et al., 2001) e queijos (ARAÚJO et al., 2002; BRANCO et al., 2003; BRITO et al., 2008; FADEL; ISMAIL, 2009; LOMONACO et al., 2009; NASCIMENTO; SABIONI; PIMENTA, 1998). Outras pesquisas demonstram, ainda, a ocorrência de EPEC e *L. monocytogenes* em superfícies de propriedades leiteiras e indústrias de laticínios (ALESSANDRIA et al., 2010; CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2011; DUFFY et al., 2009; LOMONACO et al., 2009; UNNERSTAD et al., 1996; YOSHIDA et al., 1998). Fato que torna estes relatos, ainda, de maior relevância é a recente publicação de revisões de literatura que citam diferentes classes patogênicas de *E. coli*, como a enteropatogênica, e *L. monocytogenes* dentre as espécies bacterianas mais comuns em surtos de infecções de origem alimentar (NEWELL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; SCALLAN et al., 2011).

Biofilmes usualmente consistem de populações bacterianas mistas, mas podem apresentar somente uma espécie (ANNOUS; FRATAMICO; SMITH, 2009; DONLAN, 2002; STOODLEY et al., 2002). De acordo com Annous, Fratamico e Smith (2009), talvez a mais óbvia limitação de muitos estudos realizados a respeito de biofilmes é que na maioria das vezes somente um único microrganismo é estudado. No entanto, pesquisas recentes avaliaram o desenvolvimento e a resistência de biofilmes multiespécie. Rieu et al. (2008), por exemplo, verificaram que a presença de *Staphylococcus aureus* CIP 53.156 aumentou o número de células sésseis de *L. monocytogenes* EGD-e. Simões, Simões e Vieira (2009) constataram que a associação das espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus cereus* aumentou a atividade metabólica, o conteúdo de substâncias poliméricas extracelulares e a proporção de células viáveis de ambas as bactérias no biofilme, tornando-as mais resistentes a tratamentos químicos e mecânicos. Veen e Abeen (2011) observaram que o biofilme multiespécie de *L.*

monocytogenes e *Lactobacillus plantarum*, em comparação com os biofilmes monoespécies, mostrou-se mais resistente aos sanitizantes químicos cloreto de benzalcônio e ácido peracético.

Em instalações de processamento de alimentos, biofilmes são formados em decorrência de falhas nos procedimentos de higienização e sua eliminação é um grande desafio, visto que os mesmos são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células planctônicas (SIMÕES et al., 2006; SIMÕES; VIEIRA, 2009). Além deste fato, a emergência de bactérias resistentes aos processos de sanitização convencionais demonstra claramente que novas estratégias de controle são necessárias (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Óleos essenciais de plantas condimentares, aromáticas e medicinais, que são agentes antibacterianos naturais muito potentes (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; OUSSALAH et al., 2007), têm tido sua atividade antibacteriana sob biofilmes avaliada, visando à possível utilização desses metabólitos secundários ou de seus constituintes como sanitizantes nas indústrias de alimentos (AMALARADJOU; VENKITANARAYANAN, 2011; CHORIANOPOULOS et al., 2008; LEBERT; LEROY; TALON, 2007; OLIVEIRA et al., 2010; PÉREZ-CONESA et al., 2011). Dentre os óleos essenciais que se destacam em termos de atividade antibacteriana e que, por isso, são opções promissoras a serem utilizadas como sanitizantes naturais, encontram-se os óleos essenciais das folhas de *Melaleuca alternifolia* Cheel (melaleuca, árvore de chá ou *tea tree*) e *Cymbopogon flexuosus* (D. C.) Stapf. (capim-limão da Índia Oriental ou *lemongrass*), e da casca de *Cinnamomum cassia* Blume (canela da China). Neste contexto, destaca-se, ainda, a utilização conjunta de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, prática que vem sendo empregada com o objetivo de verificar possíveis interações sinérgicas, o que aumentaria a eficiência individual desses compostos naturais.

Diante do exposto, com o presente estudo buscou-se alcançar os seguintes objetivos:

- (i) Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *C. flexuosus* e *C. cassia*, sozinhos e em combinação, sobre células planctônicas de *L. monocytogenes* e EPEC, por meio da realização de *screening* e da determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMIs).
- (ii) Avaliar a capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* e EPEC em cavidades de microplacas de poliestireno.
- (iii) Avaliar a atividade antibacteriana de diferentes concentrações dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *C. flexuosus* e *C. cassia*, sozinhos e em combinação, sobre células sésseis de *L. monocytogenes* e EPEC aderidas em cavidades de microplacas de poliestireno.
- (iv) Selecionar o óleo essencial ou combinação que apresentar maior efeito nos testes iniciais e avaliar a atividade antibacteriana do mesmo e do seu constituinte ou constituintes majoritários sobre os biofilmes monoespécie e mutiespécie de *L. monocytogenes* e EPEC formados em superfície de aço inoxidável, utilizando diferentes concentrações e tempos de contato.
- (v) Avaliar a atividade antibacteriana de sanitizantes químicos comumente utilizados em indústrias de laticínios (hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e quaternário de amônio) sobre os biofilmes monoespécie e mutiespécie de *L. monocytogenes* e EPEC formados em superfície de aço inoxidável e comparar a mesma com a atividade do óleo essencial ou combinação que apresentar maior efeito nos testes iniciais, bem como com a atividade do constituinte ou constituintes majoritários.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Esta parte da tese irá abordar, inicialmente, os aspectos gerais de biofilmes bacterianos, como definição, estrutura, composição e etapas envolvidas em seu processo de formação. Em seguida, serão relatados a respeito da presença de biofilmes em indústrias de leite e produtos lácteos, suas principais características e microrganismos envolvidos, com destaque para *L. monocytogenes* e EPEC. O procedimento de higienização será, então, descrito como principal ferramenta de controle para a formação destas comunidades bacterianas em superfícies que entram em contato com alimentos e os óleos essenciais e seus constituintes como novas e promissoras alternativas naturais.

2.1 Biofilmes bacterianos: definição, estrutura e composição

Definições a respeito do termo biofilmes bacterianos foram propostas por vários autores. Shi e Zhu (2009), por exemplo, definem biofilmes como comunidades de microrganismos aderidos a superfícies e enfatizam que este é o modo prevalente de crescimento dos mesmos na natureza. Já para Sauer, Rickard e Davies (2007), biofilmes são atualmente identificados como agrupamentos de células microbianas associadas a superfícies, os quais se encontram envoltos por substâncias poliméricas extracelulares (*extracellular polymeric substances, EPS*) hidratadas. Segundo Annous, Fratamico e Smith (2009), bactérias formam complexas comunidades que se encontram intimamente associadas a superfícies bióticas ou abióticas.

Nessa complexa rede de microrganismos que é o biofilme, células agem menos como entidades individuais e mais como sistemas de vida coletivos (ANNOUS; FRATAMICO; SMITH, 2009). Biofilmes maduros são ecossistemas altamente organizados, onde canais de água encontram-se

dispersos e fornecem passagem para troca de nutrientes, metabólitos, oxigênio e produtos de excreção. A comunidade do biofilme pode compreender apenas uma espécie bacteriana ou múltiplas espécies, arranjadas em camadas únicas de células ou em estruturas tridimensionais (SAUER; RICKARD; DAVIES, 2007). Donlan (2002), Stoodley et al. (2002) e Vlková et al. (2008) mencionam que biofilmes podem ser formados por apenas uma espécie, entretanto, usualmente mais espécies bacterianas são isoladas dos mesmos. De acordo com O'Toole, Kaplan e Kolter (2000), biofilmes multiespécies predominam na maioria dos ambientes e monoespécies são formados, por exemplo, na superfície de implantes médicos como decorrência de processos infecciosos.

No que diz respeito à composição dos biofilmes, a água é a fração mais significativa, podendo variar entre 70% a 95%, ou mais, da massa total (CHARACKLIS, 1981; FLEMMING, 1993). Há relatos de que a razão massa de água/massa de biofilme pode chegar próxima a 99% ou, mesmo, atingir valores superiores (AZEREDO; OLIVEIRA, 2000). Os microrganismos, por sua vez, representam somente pequena parte da massa e do volume do biofilme (frequentemente, menos de 10%), embora excretem substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca (PEREIRA, 2001). Segundo Flemming (1993), EPS representam de 70% a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme.

A matriz de EPS é responsável pela estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa (PEREIRA, 2001) determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas (FLEMMING; WINGENDER, 1999). Polissacarídeos, proteínas, fosfolipídeos, ácido teicoico e até mesmo ácidos nucleicos constituem as EPS (DONLAN; COSTERTON, 2002). O DNA extracelular (DNAe), liberado pela autólise de células bacterianas, forma uma importante parte da matriz de EPS, influenciando tanto na estrutura do biofilme, como na adesão inicial célula-

superfície e célula-célula (HARMSSEN et al., 2010; THEERTHANKAR et al., 2010). No entanto, proteínas e polissacarídeos, que correspondem de 75 a 89% da composição das EPS, são os principais componentes (TSUNEDA et al., 2003).

2.2 Formação de biofilmes bacterianos

Microrganismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir às superfícies. Embora esse processo necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciá-lo já são descritos, como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura (OULAHAL et al., 2008). De acordo com Donlan (2002) e Simões, Simões e Vieira (2010), a adesão de microrganismos a superfícies e o subsequente desenvolvimento de biofilmes são processos complexos afetados por diversas variáveis. Características da superfície de adesão capazes de influenciar a formação destas comunidades microbianas incluem: textura ou rugosidade, hidrofobicidade, química da superfície, carga e presença do filme condicionante. O líquido circundante, por sua vez, apresenta como características importantes: velocidade do fluxo, pH, temperatura, presença de cátions, existência de antimicrobianos e disponibilidade de nutrientes. Propriedades e características dos próprios microrganismos são a hidrofobicidade da superfície celular, a presença de apêndices extracelulares (pili, flagelos e fímbrias), a produção de EPS e de moléculas sinalizadoras.

Existem várias teorias propondo etapas para o processo de formação de biofilmes. Dentre todas as teorias consultadas é senso comum que este parte de uma etapa de adesão inicial, seguindo vários estágios de desenvolvimento, finalizando na maturação e liberação de células ou agregados celulares da

estrutura do biofilme (LASA, 2006; MELO, 1994; MOSTELLER; BISHOP, 1993; ZOTTOLA, 1994). Stoodley et al. (2002), por exemplo, propõem que o desenvolvimento de biofilmes *in vitro* envolve os seguintes cinco estágios: (i) adesão reversível das células bacterianas à superfície; (ii) adesão irreversível mediada pela formação de material exopolimérico; (iii) formação de microcolônias e início da maturação do biofilme; (iv) formação do biofilme maduro com uma estrutura tridimensional contendo células em grupos cercados por canais que permitem o transporte de água e nutrientes e a remoção de resíduos; e (v) desprendimento e dispersão das células e início da formação de um novo biofilme, as células liberadas são mais semelhantes às planctônicas (não aderentes) do que as células do biofilme maduro. Já Breyers e Ratner (2004) e Simões, Simões e Vieira (2010), apresentam uma concepção mais complexa e mencionam que o processo que governa a formação de biofilmes inclui nove etapas: (i) pré-condicionamento da superfície de adesão, tanto por macromoléculas presentes no líquido circundante como por aquelas intencionalmente colocadas na superfície; (ii) transporte de células planctônicas do líquido circundante para a superfície; (iii) adsorção das células sobre a superfície; (iv) desprendimento de células adsorvidas reversivelmente; (v) adsorção irreversível de células bacterianas sobre a superfície, como início da produção de EPS e ocorrência dos fenômeno de *quorum sensing*; (vi) transporte de substrato para dentro do biofilme; (viii) metabolização do substrato pelas células sésseis e transporte dos produtos de excreção para fora do biofilme, processos seguidos pela multiplicação celular; (viii) produção da matriz de EPS; e (ix) desprendimento de células do biofilme (Figura 1).

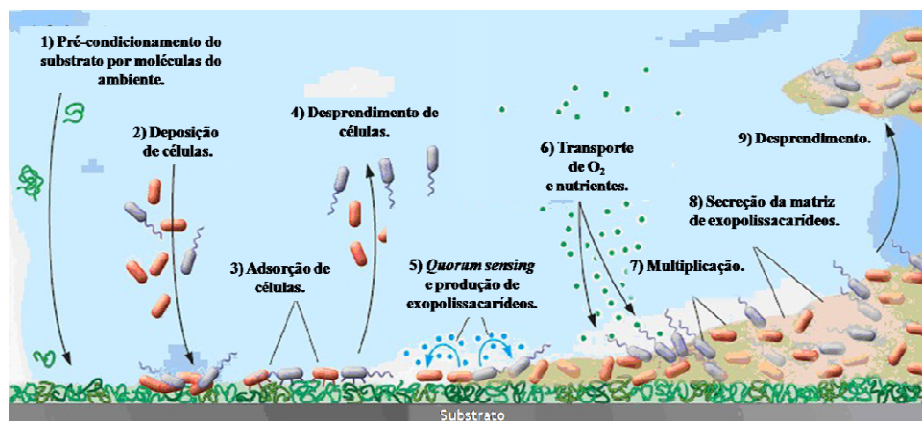


Figura 1 Processos que governam a formação de biofilmes

Fonte: Breyers e Ratner (2004) e Simões, Simões e Vieira (2010)

A formação de biofilmes multiespécies, também, deve ser levada em consideração, visto que esta é a forma prevalente dessas comunidades microbianas na natureza e em indústrias de alimentos. Rickard et al. (2003) descrevem o processo de desenvolvimento de biofilmes multiespécies em quatro etapas: (i) colonizadores primários do substrato se aderem ao filme condicionante composto de moléculas orgânicas, especialmente polissacarídeos e proteínas; (ii) ocorre crescimento das células, divisão e produção de EPS, levando ao desenvolvimento de microcolônias; (iii) a coadesão de células únicas, coagregados de células e grupos de células idênticas formam o biofilme multiespécie jovem; (iv) maturação e formação de mosaicos clonais (Figura 2).

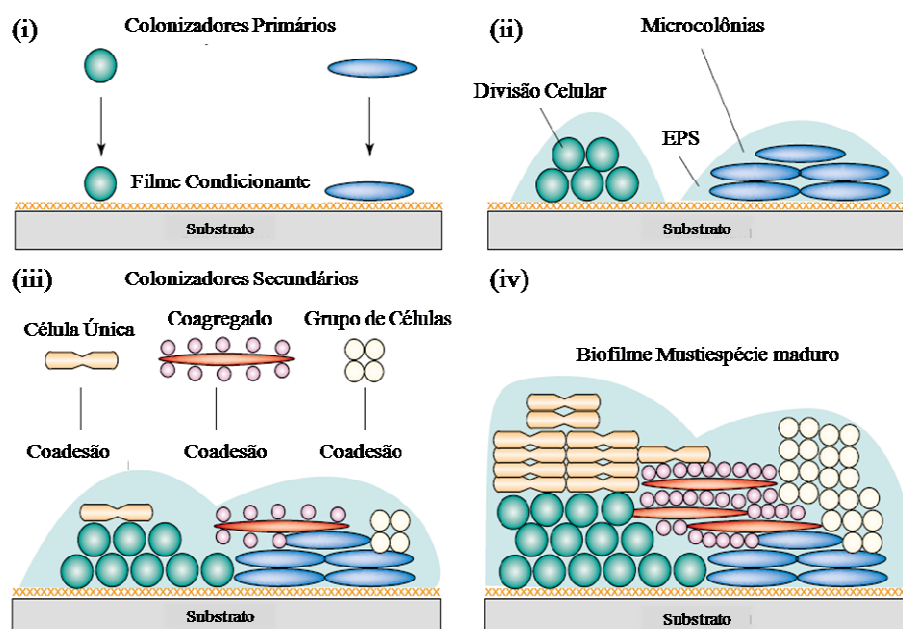


Figura 2 Diagrama ilustrando o desenvolvimento de biofilme multiespécie enfatizando os fenômenos de coagregação e coadesão, que ocorrem entre células em suspensão ou entre células sésseis e planctônicas, respectivamente

Fonte: Adaptado de Rickard et al. (2003)

Outra interessante teoria é proposta por Shi e Zhu (2009), que abordaram a formação de biofilmes microbianos enfatizando sua ocorrência em indústrias alimentícias. Segundo os autores, a formação de biofilmes microbianos em ambiente de processamento de alimentos é um processo muito complexo. Inicialmente, moléculas orgânicas provenientes do alimento são depositadas sobre a superfície de equipamentos formando o filme condicionante. Em seguida, microrganismos ativos biologicamente aderem à superfície condicionada atraídos pelas moléculas orgânicas. Algumas células microbianas persistem mesmo após a limpeza e sanitização e iniciam o crescimento do biofilme. Por último, forma-se o biofilme maduro com a ajuda da expressão de genes específicos e *quorum sensing*.

Para a indústria de alimentos, pode-se afirmar que o desprendimento de células bacterianas do biofilme é a etapa mais crítica que, por este motivo, merece destaque do ponto de vista de segurança alimentar. Além de ser reflexo do fluxo do meio aquoso que passa pelo local, o desprendimento, usado para descrever a liberação de células (individuais ou em grupos) de um biofilme, é evento ativo, regulado fisiologicamente (STOODLEY et al., 2001). No momento em que o biofilme atinge massa denominada crítica, o equilíbrio dinâmico é alcançado e a camada microbiana mais externa de sua estrutura inicia a produção de células bacterianas planctônicas (PROSSER et al., 1987). O desprendimento de células únicas ou de fragmentos pode ocorrer, também, em virtude do aumento da população microbiana, que torna o ambiente anaeróbio no interior do biofilme, provocando aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis que enfraquecem sua estrutura (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; TRACHOO, 2003). Contudo, ainda que o biofilme não tenha atingido massa crítica ou se desenvolvido completamente, microrganismos viáveis aderidos à superfície irão apresentar a habilidade de contaminar produtos alimentícios, mesmo que o número de células presentes seja baixo ou variado dentro de determinada área (VERRAN, 2002). Este fenômeno é denominado potencial de biotransferência e pode ser definido como a habilidade que o microrganismo presente na superfície do equipamento, antes ou após o procedimento de higienização, possui de contaminar produtos alimentícios durante o processamento (HOOD; ZOTTOLA, 1995; VERRAN, 2002; WIRTANEN; HUSMARK; MATTILA-SANDHOLM, 1996). Os microrganismos liberados formarão novos biofilmes ou contaminarão o alimento que passa pelo local.

Estudos iniciais a respeito de biofilmes envolviam a avaliação da capacidade de adesão bacteriana na superfície de materiais utilizados em industriais de alimentos colocados em contato com diferentes substratos, bem como percepções sobre o desenvolvimento destas comunidades. Hood e Zottola

(1997), por exemplo, verificaram que *Salmonella* Typhimurium, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Pseudomonas fragi* e *P. fluorescens* formaram biofilmes sobre superfície de aço inoxidável em contato com diferentes substratos, como leite desnatado reconstituído. Já Gram et al. (2007), pesquisando o desenvolvimento do biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável, verificaram que, quando os cupons foram imersos em emulsões de peixe ou carne, aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC/cm², foram alcançados após 2-3 dias de incubação a 20 °C.

A contaminação de alimentos por células microbianas sésseis, também, já foi demonstrada em diversos estudos. Flint et al. (2001) observaram que células vegetativas e esporos de *Bacillus stearothermophilus* são capazes de aderir em superfície de aço inoxidável, formar biofilme e contaminar o leite que passa pelo local. Midelet e Carpentier (2002) verificaram a contaminação de carnes por bactérias, incluindo *L. monocytogenes*, presentes em diferentes superfícies. Salustiano et al. (2009) avaliaram a recontaminação pós-pasteurização do leite por *B. cereus* utilizando ribotipagem automática. Sete ribogrupos foram identificados e um mesmo ribogrupo foi isolado de quatro superfícies e de amostras de leite, indicando que as superfícies são reservatórios desta espécie.

Pesquisas realizadas mais recentemente envolvem a formação de biofilmes bacterianos em cultivo combinado de duas ou mais cepas, condição que, além de afetar o número de células aderidas, pode alterar a susceptibilidade dos biofilmes formados a agentes antibacterianos. Rieu et al. (2008) estudaram a formação de biofilmes multiespécie sobre a superfície de cupons de aço inoxidável e verificaram maior número de células sésseis de *L. monocytogenes* EGD-e quando na presença de *S. aureus* CIP 53.156. Além disso, observações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelaram íntima associação entre estas bactérias quando em biofilme multiespécie. Boari et al. (2009) avaliaram a

formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *S. aureus*, em cultivo monoespécie e combinado, usando leite em diferentes temperaturas. A presença de *A. hydrophila* reduziu a adesão de *S. aureus*. Simões, Simões e Vieira (2009) constataram que a associação das espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus cereus* aumentou a atividade metabólica, o conteúdo de substâncias poliméricas extracelulares e a proporção de células viáveis de ambas as bactérias no biofilme, tornando-as mais resistentes a tratamentos químicos e mecânicos. Recentemente, Veen e Abee (2011) investigaram a formação de biofilmes monoespécie e multiespécie de cepas de *L. monocytogenes* e *L. plantarum* e verificaram que, quando associadas, as mesmas se tornam mais resistentes aos sanitizantes químicos cloreto de benzalcônio e ácido peracético.

2.3 Biofilmes bacterianos na indústria de leite e produtos lácteos

No Brasil, inúmeros estudos vêm sendo realizados com o objetivo de investigar a qualidade microbiológica do leite e de produtos lácteos. De maneira geral, os resultados obtidos apontam produtos de qualidade insatisfatória (FEITOSA et al., 2003; NERO et al., 2005; ROCHA; BURITI; SAAD, 2006; SANGALETTI et al., 2009; SILVA et al., 2010; TEBALDI et al., 2008; VALLIN et al., 2009; ZEGARRA et al., 2009). De acordo com Bremer, Fillery e McQuillan (2006) e Flint, Bremer e Brooks (1997), quando os produtos lácteos são contaminados microbiologicamente, evidências sugerem que os biofilmes formados nas superfícies dos equipamentos de processamento são os principais responsáveis.

Nas indústrias de laticínios, os biofilmes, além de conterem bactérias e EPS, contêm, também, significativa quantidade de resíduos de leite, particularmente proteínas e minerais, como o fosfato de cálcio (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; FLINT; BREMER; BROOKS, 1997;

KUMAR; ANAND, 1998; MITTELMAN, 1998). Bremer, Fillery e McQuillan (2006), analisando por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a formação de biofilme na superfície de cupons de aço inoxidável, após 18 horas de contato com leite, verificaram que algumas células bacterianas encontravam-se associadas a detritos e, provavelmente, a proteínas e carboidratos.

A contaminação do leite pode se iniciar na fazenda, durante e/ou após a ordenha. Diversos fatores são responsáveis pela perda da qualidade microbiológica nesta etapa, com destaque a ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão. Segundo Oliver, Jayaro e Almeida (2005), microrganismos podem se aderir a equipamentos de processamento de leite que entram em contato direto com contaminantes do ambiente de propriedades leiteiras, como matéria fecal ou úbere de animais infectados e, também, pela água utilizada nas ordenhadeiras mecânicas. Diversos autores mencionam que estes microrganismos podem formar biofilmes, difíceis de erradicar e que podem agir como abrigo e/ou substrato para microrganismos menos propensos à formação, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos mesmos e a posterior disseminação durante o processamento de alimentos (LAPIDOT; ROMLING; YARON, 2006; LEHNER et al., 2005; LOMANDER et al., 2004; MØRETRØ; LANGSRUD, 2004). Falhas no armazenamento e transporte do leite para as indústrias, como tempo e temperatura inadequadas, podem favorecer a multiplicação dos microrganismos presentes.

Por meio da matéria-prima, do ambiente, dos manipuladores e de outras fontes, os microrganismos entram na linha de produção (POMPERMAYER; GAYLARD, 2000). Uma vez dentro do ambiente de processamento de alimentos, microrganismos encontram condições favoráveis para a formação de biofilmes, como superfícies para adesão, ampla distribuição de alimentos (GIBSON et al., 1999), processamento de alimentos com produção em massa e

operação de equipamentos por longo turno (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; LINDSAY; HOLY, 2006). O processo de automação das indústrias e o desenvolvimento de equipamentos mais complexos propiciam grande número de nichos para adesão e multiplicação de microrganismos, contribuindo, assim, para o aumento da formação de biofilmes (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; FLINT; BREMER; BROOKS, 1997).

Na indústria de laticínios a contaminação do leite e produtos lácteos, após a pasteurização ocorre, principalmente, em função dos equipamentos de envase (DOGAN; BOOR, 2003; WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002). Biofilmes podem se desenvolver na lateral das juntas dos equipamentos, sendo, também, fonte de contaminação dos alimentos após a pasteurização (AUSTIN; BERGERON, 1995). A contaminação do leite pasteurizado, também, pode ocorrer pela adesão de bactérias nas placas dos pasteurizadores de leite (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997). Superfícies do ambiente (pisos e paredes) podem ser fontes indiretas de contaminação, exemplos deste fato são a transferência de microrganismos aos alimentos por vetores, como o ar, pessoas e sistemas de limpeza (GIBSON et al., 1999; HOLAH, 1992).

Superfícies de aço inoxidável são reconhecidas como importantes fontes de contaminação microbiana durante o processamento de alimentos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Na indústria de laticínios, diversos equipamentos são compostos por aço inoxidável, como tanques de expansão, tanques para fabricação de queijos, batedeiras de manteiga, iogurteiras, homogeneizadores e pasteurizadores de leite. De acordo com Andrade, Pinto e Rosado (2008a) há diversos tipos de aço inoxidável, mas os que contêm 18% de cromo e 15% de níquel são os mais utilizados. Neste grupo estão as ligas da classe 300, por exemplo, 304 e 316, muito utilizadas em indústrias de alimentos após serem submetidas ao polimento 4. Segundo Shi e Zhu (2009), o aço inoxidável tipo 304, utilizado nas indústrias de processamento de alimentos, é

ideal para fabricação de equipamentos em virtude de estabilidade físico-química e elevada resistência à corrosão. Mattila-Sandholm e Wirtanen (1992) mencionam que superfícies de aço inoxidável podem ser facilmente higienizadas, além de serem resistentes contra agentes químicos.

A formação de biofilmes em superfícies de indústrias de laticínios pode levar a sérios problemas de saúde pública e a perdas econômicas mediante a deterioração de alimentos e a danificação de equipamentos (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; GRAM et al., 2007). Microrganismos em biofilme catalisam reações químicas e biológicas que causam a corrosão de metais de tubulações e tanques (MITTELMAN, 1998; VIEIRA; MELO; PINHEIRO, 1993), processo este denominado de biocorrosão ou corrosão microbiologicamente influenciada (*Microbially Influenced Corrosion, MIC*) (BEECH; SUNNER, 2004; MANSFELD, 2007). A eficácia de transferência de calor pode ser reduzida se biofilmes se tornarem suficientemente espessos em placas de trocadores de calor e tubulações (MITTELMAN, 1998; VIEIRA; MELO; PINHEIRO, 1993). Em consequência, há perdas de energia e despesas acrescidas de limpeza e manutenção por meio da substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos (CHARACKLIS, 1990).

Vários são os gêneros e espécies bacterianas capazes de se aderir e formar biofilmes em superfícies que entram em contato com leite ou produtos lácteos. Sharma e Anand (2002) verificaram a presença de bactérias em biofilmes multiespécie na superfície de diferentes segmentos das linhas de pasteurização de leite de uma planta de processamento comercial. *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus* foram os principais gêneros de bactérias Gram-positivas encontradas. Já para Gram-negativos houve predominância de *Shigella*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter*, *Flovobacterium* e *Proteus*. Segundo Vlková et al. (2008), em propriedades

leiteiras e na indústria de laticínios, biofilmes podem consistir de bactérias patogênicas, como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *B. cereus*.

A existência de bactérias patogênicas em alimentos e superfícies que entram em contato com os mesmos aumenta o risco de perda da segurança alimentar (SHI; ZHU, 2009), pois células em biofilme podem se desprender e contaminar o alimento que passa pelo local (MIDELET; CARPENTIER, 2004). A contaminação do leite e de seus derivados por bactérias patogênicas pode ocasionar a veiculação de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Este fato é ainda mais relevante em virtude da composição química destes produtos, pH próximo à neutralidade e alta atividade de água (a_w), características que propiciam ambiente favorável para o desenvolvimento destes microrganismos e alcance de níveis de risco. Segundo Oulahal et al. (2008), o leite é exemplo de substrato heterogêneo, apresentando complexa mistura de numerosos tipos de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais. Tronco (2003) menciona que, por sua composição completa e balanceada, o leite é substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Para Riedel (1992), diversos microrganismos patogênicos podem ser encontrados contaminando o leite e dentre eles podem-se destacar as bactérias *E. coli* e *L. monocytogenes*.

2.4 *Escherichia coli* enteropatogênica

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae e são bacilos Gram-negativos de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 μm . Alguns têm a capacidade de motilidade possuindo flagelos peritríquios, são anaeróbicos facultativos e fermentam a glicose com formação de ácido e gás (HOLT et al., 1994). Pode crescer entre pH de 4,4 a 9 (INTERNATIONAL COMMISSION ON

MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICSMF, 2000), porém é conhecida sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, que lhe permitem sobreviver no trato intestinal (SAINZ et al., 2005). Em condições ótimas, pode se multiplicar em atividade de água (a_w) acima de 0,95. A temperatura de crescimento varia de 7 a 48 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima (VARNAM; EVANS, 1991). No entanto, diversos autores têm observado crescimento em alimentos de algumas cepas de *E. coli* a temperaturas menores, como 4 °C, por vários dias (ANANG et al., 2007; GONZÁLEZ-MONTALVO et al., 2007).

A espécie *E. coli* inclui cepas não virulentas, que têm como hábitat o trato entérico de humanos e animais saudáveis, e cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocar surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. A presença de cepas não patogênicas em alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerado o indicador clássico da possível presença de microrganismos patogênicos. Contagens elevadas de *E. coli*, também, relacionam-se à falta de higiene e falhas no processamento de alimentos (ICSMF, 2000; YUCEL; ULUSOY, 2006).

Cepas de *E. coli* diarreio gênicas (*diarrheagenic E. coli*, DEC) são classificadas em seis categorias: EPEC, enterotoxigênica (*enterotoxigenic E. coli*, ETEC), enterohemorrágica (*enterohaemorrhagic E. coli*, EHEC), enteroinvasiva (*enteroinvasive E. coli*, EIEC), enteroagregativa (*enteroaggregative E. coli*, EAaggEC) e de aderência difusa (*diffusely adherent E. coli*, DAEC) (CHEN; FRANKEL, 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

EPEC foi a primeira cepa de *E. coli* a ser descrita, quando foi incriminada como causa de surtos de diarreia infantil na década de 40 (BRAY, 1945). Uma das principais características da infecção por esta bactéria é a diarreia

ia do tipo aquoso contendo muco, mas não sangue, que pode ocorrer em diversos graus de intensidade. Além disso, é comum que as crianças infectadas apresentem vômito e febre (NATARO; KAPER, 1998). EPEC induz uma alteração histopatológica no intestino conhecida como lesão de aderência e eliminação (*attaching and effacing, A/E*). A lesão ocorre mediante complexo mecanismo de virulência, que induz á degeneração das microvilosidades e altera a morfologia normal da região apical dos enterócitos. O modelo de patogênese por EPEC pode ser dividido em três fases: (i) aderência inicial à célula do hospedeiro; (ii) produção e translocação de proteínas bacterianas por meio de um sistema de secreção do tipo III e (iii) contato íntimo da bactéria com formação de uma estrutura semelhante a um pedestal por proteínas do citoesqueleto (inclusive actina) (CHEN; FRANKEL, 2005; JAY, 2005; VIDAL et al., 2007) (Figura 3).

A proteína intimina é necessária à adesão bacteriana da célula ao hospedeiro, enquanto a formação de tufo de pili é responsável pela aderência localizada, caracterizada pela habilidade da bactéria em formar microcolônias na superfície das células epiteliais intestinais pela auto-aglutinação das células (CHEN; FRANKEL, 2005; JAY, 2005; OCHOA et al., 2008). Cepas atípicas de EPEC não possuem o gene *bpfA*, formador de tufo de pili, apenas o gene *eae*, produtor de intimina (OCHOA et al., 2008).

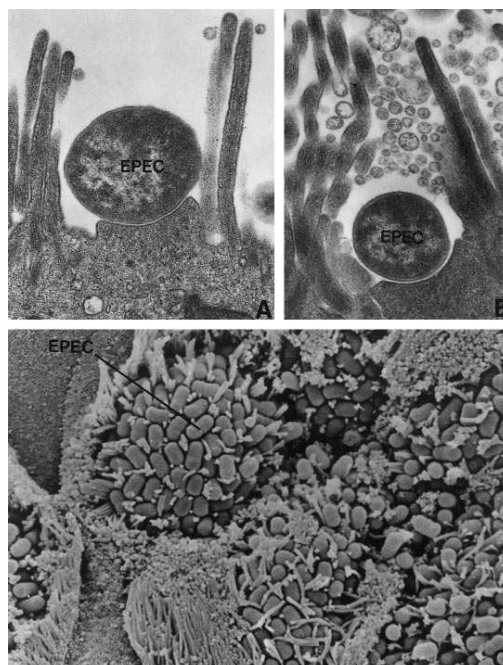


Figura 3 Eletromicrografias de varredura e transmissão ilustrando as características chaves da lesão histopatológica de aderência e eliminação causada pela *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). (A) Formação de estrutura semelhante a um pedestal. (B) Destruição localizada das microvilosidades. (C) Adesão bacteriana, com perturbação grosseira da arquitetura das microvilosidades

Fonte: Frankel et al. (1998)

A presença de *E. coli* enteropatogênica em leite e derivados lácteos, bem como em superfícies de indústrias de laticínios, já foi verificada em alguns estudos. Altalhi e Hassan (2009) verificaram, entre 33 cepas de *E. coli* isoladas de amostras de leite cru, que 9,1% continham o gene *eaeA*, relacionado a EPEC. Silva et al. (2001) isolaram 208 cepas de *E. coli* de amostras de leite pasteurizado, entre as quais 46 (22,1%) foram sorogrupadas como EPEC. O sorogrupo mais frequente foi o O55 (15,2%), contudo, diversos outros sorogrupos foram encontrados, como O26, O126, O127, O111 e O114. De acordo com Trabulsi et al. (1996), o sorogrupo O55 de EPEC é um dos mais

prevalentes em diarreias infantis no Brasil. Araújo et al. (2002), analisando 45 amostras de queijo, isolaram EPEC de 21,1% e verificaram que os sorogrupos mais frequentes foram O127, seguidos por O55 e O26. Nascimento, Sabioni e Pimenta (1988), pesquisando a incidência de EPEC em 605 cepas de *E. coli* isoladas de 51 amostras de queijo tipo Minas frescal, constataram que a percentagem de isolamento foi de 9,8%, quando considerado o número de amostras. Os sorogrupos isolados foram O86, O127, O125 e O26. Duffy et al. (2009) detectaram EPEC atípica no ambiente de uma planta de processamento de leite em pó, pela presença dos genes *eaeA* e *escV*, o último responsável pela codificação de componentes do aparato de secreção tipo III. Vários locais foram amostrados, como drenos, calhas e superfícies em geral. Segundo Kaper, Nataro e Mobley (2004), em países industrializados cepas atípicas de EPEC são mais frequentemente isoladas de casos de diarreia.

2.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, halotolerante, não formadora de esporos e desprovida de cápsula. Possui morfologia de bacilo, diâmetro de 0,4-0,5 μm , comprimento de 0,5-2,0 μm , extremidades arredondadas e flagelos peritríquios que permitem sua motilidade (ADAMS; MOSS, 2004; ROCOURT, 1999). Os sorotipos encontrados são 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998). A faixa de pH para crescimento desta bactéria situa-se entre 5,6 a 9,6 (SWAMINATHAN, 2001), embora tenha sido constatado crescimento em pH abaixo de 4,0. A atividade de água (a_w) ótima é maior que 0,97, porém, a mínima varia entre 0,90-0,93 (LOU; YOUSEF, 1999). Possui capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de -0,4° a 50 °C, apresentando crescimento ótimo entre 30 e 37 °C

(SEVERINO, 2006). Sua natureza psicrotrófica permite seu desenvolvimento em alimentos refrigerados (BORUCKI et al., 2003).

Denomina-se listeriose a doença causada pela ingestão de alimentos contendo *L. monocytogenes* (SWAMINATHAN, 2001). O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas, contudo, a dose infectante necessária para causar a doença, ainda, não está bem definida. A dose aproximada, relatada de casos, varia de 10^3 a 10^9 UFC/g ou mL (DALTON et al., 1997), mas há relatos de surtos com contaminação muito baixa (MEAD et al., 1999). A manifestação clínica da doença é descrita de duas formas, listeriose gastrointestinal (não-invasiva) e listeriose invasiva (SWAMINATHAN, 2001). A listeriose não-invasiva pode causar infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis, mas normalmente não evolui para óbito (CARRIQUE-MAS et al., 2003; GAHAN; HILL, 2005). Já a listeriose invasiva é uma doença severa, pois, a taxa de mortalidade é alta (20 a 30%), principalmente, para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, a terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico deprimido (SWAMINATHAN, 2001). As manifestações mais comuns são meningite, meningoencefalite, septicemia e aborto (DONELLY, 2001).

Dados de novembro de 2011 do Centers for Disease Control and Prevention - CDC (2011) reportam um importante surto de listeriose, envolvendo, até o momento, 139 indivíduos de diferentes estados dos Estados Unidos, em razão do consumo de melões cantaloupe provenientes de fazendas do Colorado. Vinte e nove mortes e um aborto foram relatados. Os indivíduos atingidos apresentavam idade variando de <1 a 96 anos, com média de 77 anos. Indivíduos mais afetados apresentavam idade acima de 60 anos. A grande maioria dos afetados foi hospitalizada. Entre as mortes, as idades estavam entre 48 e 96 anos, com média de 81 anos. Cinco das doenças estavam relacionadas

com a gravidez, dois recém-nascidos e três mulheres grávidas foram diagnosticados com listeriose.

Os estágios do ciclo de vida intracelular da listeriose invasiva podem ser observados na Figura 4.

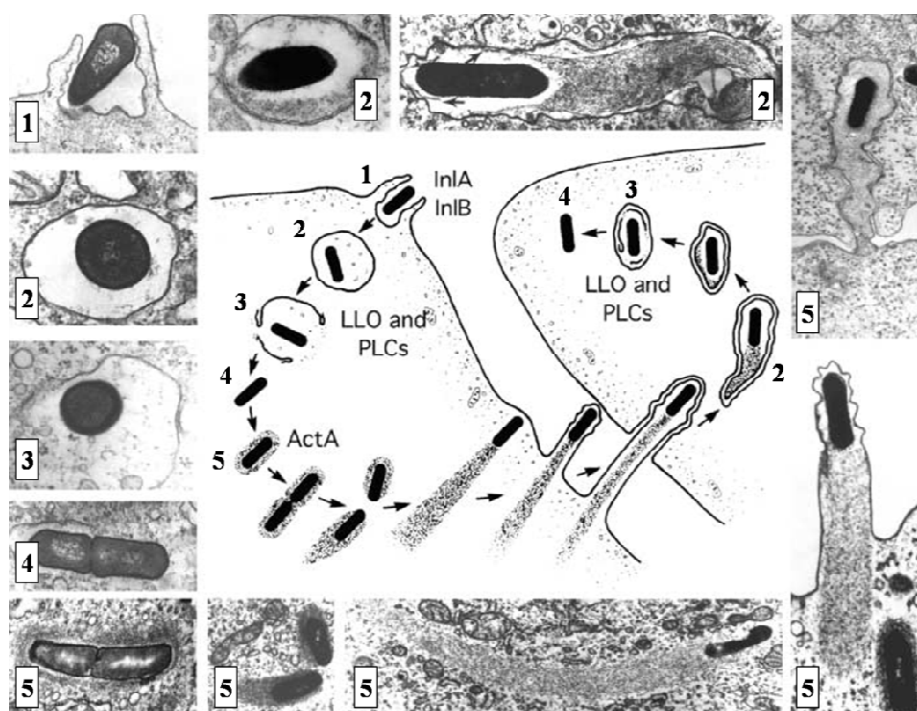


Figura 4 Eletromicrografias de transmissão e desenho dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. (1) A penetração no epitélio intestinal ocorre pela atuação de duas proteínas de superfície: internalina A (InlA) e internalina B (InlB). (2) A bactéria é fagocitada por macrófagos do hospedeiro. (3) A lise da membrana fagocítica ocorre pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fosfolipases C (PLCs). (4) A bactéria ganha acesso ao citoplasma celular. (5) O movimento inter e intracelular ocorre pela polimerização de uma cauda de actina no citoplasma do hospedeiro, pela ação da proteína de superfície ActA. A bactéria se dissemina pela corrente sanguínea, ganhando acesso a diferentes órgãos

Fonte: Adaptado de Portnoy, Auerbuch e Glomski (2002) e Tilney e Portnoy (1989)

Espécies de *Listeria* foram inicialmente isoladas do solo, poeira, água, esgoto, vegetais e silagem (HOFER; PÓVOA, 1984). Entretanto, na atualidade, os representantes patogênicos do gênero *Listeria* adquiriram extraordinária importância, em virtude de sua veiculação por alimentos (HOFER, 2001; SEVERINO, 2006). Pesquisas indicam a presença de *L. monocytogenes* em leite cru (CATÃO; CEBALLOS, 2001; KALOREY et al., 2008; VANEGAS et al., 2009; YOSHIDA et al., 1998), leite pasteurizado (CATÃO; CEBALLOS, 2001), queijo de coalho (BRANCO et al., 2003; DUARTE et al., 2005), queijo artesanal (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007) e queijo minas frescal (BRITO et al., 2008; CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007; SILVA, I. et al., 2003).

Microrganismos do gênero *Listeria*, também, têm sido encontrados em diferentes superfícies de propriedades leiteiras e plantas de processamento de leite e derivados. Yoshida et al. (1998), por exemplo, encontraram *L. monocytogenes* em diferentes locais de tanques de expansão, como parede interna e externa, válvula de descarga e agitador. Os autores verificaram, ainda, que estes equipamentos eram fonte de contaminação do leite cru por esta bactéria. Alessandria et al. (2010), empregando métodos moleculares, verificaram a presença de *L. monocytogenes* em equipamentos que entram em contato com queijo, durante o processamento e embalagem e em algumas superfícies foram encontrados valores de 10^4 - 10^5 UFC/cm². Pelos resultados da caracterização molecular, os autores observaram que cepas presentes na salmoura eram geneticamente relacionadas às encontradas nos equipamentos e nos produtos finais, sugerindo a rota de contaminação deste patógeno no laticínio. Neste contexto, Simões, Simões e Vieira (2010) mencionam que *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver por longos períodos em instalações de processamento de leite e derivados. Unnerstad et al. (1996), por exemplo, verificaram que *L. monocytogenes* persistiu no ambiente de uma indústria de laticínios por sete anos.

2.6 Higienização na indústria de leite e produtos lácteos

As principais fontes de contaminação do leite e produtos derivados ocorrem comumente, por causa da limpeza e sanitização inapropriada de equipamentos (GIBSON et al., 1999; JESSEN; LAMMERT, 2003). Na cadeia de produção de alimentos há correlação positiva entre falhas nos procedimentos de higiene e formação de biofilmes bacterianos, pois, havendo condições as células aderidas evoluem para microcolônias e, posteriormente, ao biofilme maduro (ZOTTOLA, 1994). Desta forma, é de extrema importância a higienização dos equipamentos de processamento levando em consideração tanto a composição orgânica e inorgânica dos depósitos como também a microbiota constitutiva da superfície (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997; MITTELMAN, 1998). Atualmente, verifica-se que melhorias na limpeza e sanitização têm ajudado a reduzir a persistência dessas bactérias, que são mais resistentes a processos físicos e agentes químicos do que suas respectivas formas planctônicas (ANNOUS; FRATAMICO; SMITH, 2009).

O aumento da resistência de bactérias em biofilme pode ser causado por vários fatores, além da expressão de genes envolvidos na resposta geral ao estresse e bombas de efluxo (DRENKARD, 2003; ITO et al., 2009; STEWART, 2002). O EPS limita a difusão de sanitizantes e pode causar a inativação dos mesmos e a emergência de uma arquitetura específica, bem como a alta densidade bacteriana no interior do biofilme parecem também estar envolvidas (ITO et al., 2009; STEWART, 2002; VIDAL; RAGOT; THIBAUT, 1997; WIRTHLIN; CHEN; HOOVER, 2005). Bactérias localizadas na periferia do biofilme possuem melhor acesso a oxigênio e nutrientes, enquanto que as presentes nas camadas internas, em virtude da utilização limitada destas substâncias, demonstram reduzida taxa metabólica e, consequentemente, crescimento em fase estacionária, sendo menos acessíveis e, até mesmo, menos

susceptíveis a antimicrobianos, agentes que, muitas vezes, possuem como alvo a produção de algum tipo de macromolécula (STEWART, 2002; XU; MCFETERS; STEWART, 2000). Biofilmes formados por diferentes espécies representam um desafio a mais, pois, elas podem proteger umas as outras durante a aplicação de agentes químicos. Este fato é causado pela diferente resistência de uma respectiva espécie microbiana contra os agentes utilizados (VIDAL; RAGOT; THIBAUT, 1997; WIRTHLIN; CHEN; HOOVER, 2005). Por último, doses subletais de agentes biocidas aplicadas em células em biofilmes podem ocasionar resistência (GILBERT; ALLISON; MCBAIN, 2002), em indústrias de alimentos; este fato seria caracterizado pela utilização incorreta de produtos empregados no procedimento de higienização.

A higienização inclui as etapas de limpeza e sanitização das superfícies de alimentos, ambientes de processamento, equipamentos, utensílios, manipuladores e ar de ambientes de processamento. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos, principalmente, por carboidratos, proteínas, gorduras e minerais. Os detergentes ácidos controlam depósitos minerais, como fosfato de cálcio. Os detergentes alcalinos apresentam a função de saponificar ácidos graxos, pela liberação de íons hidroxila (OH^-). A solubilização de proteínas, também, é função dos agentes alcalinos e ocorre por causa do aumento do pH ocasionado pela liberação dos íons hidroxila. Em pH elevado, os resíduos proteicos apresentam carga negativa, repelem-se, entram em suspensão e são facilmente arrastados pela solução. Dentre os alcalinos, inclui-se o hidróxido de sódio (NaOH), que libera 100% de alcalinidade cáustica e é amplamente empregado pelo método de limpeza em circuito fechado, mais conhecido como *Cleaning In Place* (CIP). Este método de higienização permite o uso de agentes ou formulações que liberam alta alcalinidade cáustica, temperaturas mais

elevadas e maior tempo de contato das soluções de limpeza (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b).

Apesar da etapa de limpeza ser capaz de remover alguns dos microrganismos presentes na superfície, observa-se que a maioria, ainda, permanece aderida, principalmente, quando biofilmes bacterianos maduros estão presentes. Esta afirmação foi comprovada no trabalho realizado por Bremer, Fillery e McQuillan (2006), que avaliaram o efeito da lavagem ácida e cáustica na remoção de biofilmes bacterianos formados em superfície de aço inoxidável em contato com leite. Às 18 horas de formação do biofilme, o número de células aderidas foi de, aproximadamente, 5 Log UFC/cm² e após a utilização de NaOH (1%) durante 10 minutos a 65 °C e 1,5 m/s notou-se a redução de apenas 1,8 Log.

Geralmente, sanitizantes não agem em resíduos de matéria orgânica e inorgânica, que permanecem na superfície após processos de limpeza realizados incorretamente, e não penetram na matriz do biofilme, não sendo capazes de destruir totalmente as células sésseis viáveis (SIMÕES et al., 2006). Portanto, pode-se afirmar que a limpeza é a primeira etapa da higienização, sendo de realização obrigatória e de fundamental importância para o sucesso do processo de sanitização dos equipamentos (FORSYTHE et al., 1998). A realização da etapa de limpeza inadequadamente, também, pode favorecer a adesão de microrganismos e formação de biofilmes. De acordo com Maukonen et al. (2003) é importante remover efetivamente os restos de alimentos e outros resíduos que podem conter microrganismos ou promover o crescimento microbiano. Segundo Kumar e Anand (1998), proteínas do leite, as quais se ligam às superfícies das indústrias de processamento de alimentos, usualmente condicionam as superfícies para sedimentação e adesão das células microbianas. Gram et al. (2007) mencionam que o processo de limpeza pode remover 90% ou mais dos microrganismos associados com a superfície, mas não pode ser

utilizado com o intuito de inativá-los. As bactérias removidas podem se depositar novamente em outros locais e obterem água, nutriente e o tempo necessário para a formação de biofilmes. Assim, a sanitização deve ser obrigatoriamente realizada.

Com a sanitização objetiva-se eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos deteriorantes para níveis considerados seguros. Os sanitizantes químicos mais utilizados em superfícies de equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, como o cloreto de alquil dimetil benzil amônio; compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, como o hipoclorito de sódio e de cálcio; compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, como o dicloroisocianurato de sódio; peróxido orgânico (ácido peracético); peróxido inorgânico (peróxido de hidrogênio); iodo e seus derivados (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008b; BRASIL, 1988, 1993, 1999).

Dentre os fatores que mais interferem na eficiência dos sanitizantes químicos, utilizados em indústrias de laticínios, está a presença de resíduos de leite e seus derivados. Uma das características desejáveis para estes compostos é serem ativos mesmo na presença de matéria orgânica. No entanto, verifica-se que a inativação do efeito antimicrobiano na presença destas substâncias pode não ocorrer, ou pode ocorrer em maior ou menor intensidade dependendo do princípio ativo utilizado. Assim, é prática comum e desafiadora da eficiência de sanitizantes químicos a avaliação da atividade antibacteriana em elevado conteúdo de matéria orgânica. Souza e Daniel (2005) compararam o efeito do hipoclorito de sódio e do ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *Clostridium perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. O ácido peracético foi mais efetivo que o hipoclorito de sódio na inativação dos microrganismos, mesmo na presença de elevada concentração de matéria orgânica. Já Kich et al. (2004) verificaram que desinfetantes à base de amônia

quaternária, hipoclorito de sódio (0,1%), glutaraldeído/cloreto de benzalcônio e iodóforo tiveram sua atividade contra *Salmonella Typhimurium* prejudicada na presença de matéria orgânica (soro bovino estéril). Nesta condição somente hipoclorito de sódio (1%), fenol e ácido peracético foram eficazes.

2.7 Óleos essenciais e seus constituintes: novas alternativas para o controle de biofilmes bacterianos

Óleos essenciais são compostos naturais voláteis e complexos, caracterizados por forte odor e formados pelas plantas aromáticas como metabólitos secundários. São líquidos, límpidos e raramente coloridos, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos, apresentando densidade, geralmente, menor que a da água. Podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais, como brotos, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, cascas; e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Esses compostos têm sido amplamente utilizados, em função de suas propriedades já observadas na natureza, como atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida. Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrônômica, de alimentos, sanitária, de cosméticos e perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

Os componentes dos óleos essenciais incluem essencialmente dois grupos de origem biossintética distinta. O grupo principal é composto pelos terpenos e o outro por fenilpropanoides, todos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008; BETTS, 2001; BOWLES, 2003; CARSON; HAMMER, 2011; CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). De acordo com descrições de Carson e Hammer

(2011) e Santos (2007), a origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como os fenilpropanoides. O acetato, por sua vez, fornece as unidades acetila que compõem o intermediário reativo, acetil-CoA, o verdadeiro precursor de vários grupos de substâncias, como os terpenos, polímeros de isopreno (C_5H_8) conhecidos como terpenoides quando contém oxigênio. Ainda segundo Wanke, Skorupinska-Tudek e Swiezewska (2001), uma rota via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) é, também, responsável pela biossíntese de terpenos.

Considerando que os óleos essenciais são formados por diversos constituintes, torna-se difícil atribuir a eficácia da atividade antimicrobiana a apenas um deles. O mecanismo de ação de um dado constituinte pode diferir quando comparado ao de outros, sendo relatados vários alvos na célula microbiana (AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR; DEL-TORO-SÁNCHEZ, 2009). A interação inicial entre os componentes dos óleos essenciais e a célula microbiana parece ser a difusão passiva da molécula componente, por meio da parede celular de bactérias Gram-positivas e fungos ou membrana externa de bactérias Gram-negativas (HAMMER; CARSON, 2011). Contudo, pode ocorrer, também, interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias Gram-negativas, conforme demonstrado recentemente por La Storia et al. (2011), que utilizaram carvacrol contra diferentes espécies bacterianas. Óleos essenciais são compostos tipicamente lipófilos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento da permeabilidade por danificar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos (BAKKALI et al., 2008). O aumento da fluidez da membrana

parece estar entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento com óleos essenciais. A expansão e aumento da fluidez da membrana citoplasmática podem levar à quebra da integridade com consequente perda de pequenos componentes intracelulares, como hidrogênio, potássio e sódio. A perda destes íons está associada ao decréscimo do potencial de membrana, pH intracelular e *pool* de ATP, causado pelo dano ao gradiente de íons que ocorre entre o interior e exterior da célula. Concentrações elevadas de óleos essenciais ou longos tempos de exposição podem acarretar danos maiores à membrana citoplasmática, ocasionando perda de macromoléculas, como DNA e proteínas, extritamente relacionada à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011). Ainda, segundo Ayala-Zavala, González-Aguilar e Del-Toro-Sánchez (2009) e Burt (2004), o mecanismo de ação dos óleos essenciais, fenômeno complexo e diversificado, pode incluir: destruição da parede celular e membrana citoplasmática, danificação de proteínas de membrana, liberação de conteúdo celular, coagulação do citoplasma, depleção da força próton motiva, inativação de enzimas essenciais e perturbação da funcionalidade do material genético. Os principais mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana, bem como os locais onde estes ocorrem, encontram-se ilustrados na Figura 5.

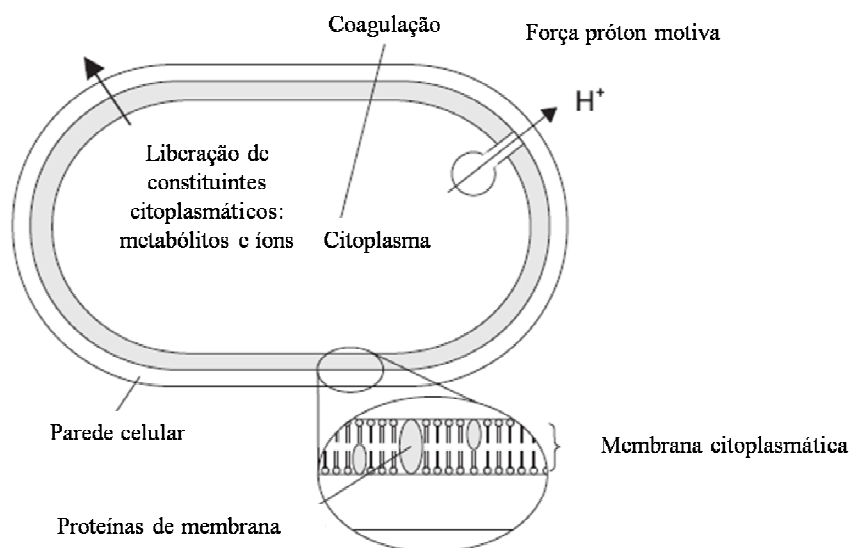


Figura 5 Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana

Fonte: Adaptado de Burt (2004)

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais é uma característica importante destes compostos que já foi relatada *in vitro* inúmeras vezes (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; OUSSALAH et al., 2007; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; TRAJANO et al., 2009). Por causa desta característica, ao chamado “consumismo verde”, caracterizado pelo apelo por parte dos consumidores para redução da utilização de conservantes químicos, e a necessidade de desenvolvimento de novos antimicrobianos visando sanar o problema de resistência microbiana, as alternativas convencionais, estudos vêm sendo realizados sobre o emprego de óleos essenciais no controle de microrganismos em alimentos (CARSON; HAMMER, 2011; FISHER; PHILLIPS, 2006; KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATIS, 2008; SOLOMAKOS et al., 2008; SOUZA et al., 2009). Utilização ainda mais recente, que também corrobora com a

necessidade do desenvolvimento de antimicrobianos naturais, é a utilização de óleos essenciais no controle de biofilmes. Lebert, Leroy e Talon (2007), por exemplo, constataram efeito significativo do óleo essencial de *Satureja thymbra* na redução do número de células dos biofilmes monoespécie e multiespécie de *Pseudomonas fragi*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus succinus* e *Lactobacillus sakei*. Já Chorianopoulos et al. (2008) verificaram que o óleo essencial e o hidrolato de *S. thymbra* possuem efeito contra os biofilmes monoespécies e multiespécies de *Staphylococcus simulans*, *Lactobacillus fermentum*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica* e *L. monocytogenes*. Oliveira et al. (2010), por sua vez, constataram que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*, sozinhos e em combinação, são novas alternativas para a sanitização de superfícies industriais de aço inoxidável contaminadas por *L. monocytogenes*. Em estudo realizado recentemente por Amalaradjou e Venkitanarayanan (2011) o biofilme de *Cronobacter sakazakii*, formado sobre superfícies abióticas, foi inibido e inativado por trans-cinamaldeído.

A combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas pode representar alternativa para potencializar a ação dos mesmos (PEREIRA et al., 2008). O termo sinergismo é definido como o aumento da atividade de compostos ou fatores quando aplicados em conjunto, comparada à atividade dos mesmos, quando utilizados individualmente (CEYLAN; FUNG, 2004; WILLIAMSON, 2001). Tratando-se de óleos essenciais, vários estudos realizados *in vitro*, utilizando a combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, alcançaram resultados promissores (AL-BAYATI, 2008; FU et al., 2007; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; OLIVEIRA et al., 2011), o que demonstra que esta é uma alternativa viável a ser utilizada no controle de biofilmes microbianos.

2.8 Espécies vegetais produtoras de óleos essenciais

Inúmeras são as espécies vegetais nas quais a produção de óleos essenciais já foi relatada. A seguir serão descritas as características gerais das espécies vegetais utilizadas neste estudo e dos seus óleos essenciais, com destaque ao potencial antibacteriano dos mesmos.

2.8.1 *Melaleuca alternifolia* Cheel (melaleuca, árvore de chá ou *tea tree*)

A espécie *M. alternifolia* (Myrtaceae) é uma árvore de até 5 m, conhecida internacionalmente como *tea tree*. Possui casca fina, semelhante a folhas de papel, e folhas afiladas de aproximadamente 20 mm de comprimento (Figura 6), florescendo no verão. É nativa da costa subtropical nordeste, região de *New South Wales*, Austrália, crescendo em regiões pantanosas ou próximas a rios (RIEDL, 1997). Seu principal produto é o óleo essencial, de grande importância medicinal, pelo fato de possuir comprovada ação bactericida e antifúngica contra vários patógenos humanos, sendo utilizado em muitas formulações tópicas (GUSTAFSON et al., 1998; RIEDL, 1997).



Figura 6 *Melaleuca alternifolia*. (A) Aspecto do cultivo. (B) Detalhe dos ramos e folhas

Fonte: Biasi e Deschamps (2009)

O óleo essencial de *M. alternifolia* é um óleo volátil obtido por destilação por arraste a vapor ou hidrodestilação das folhas. O rendimento é de aproximadamente 1 a 2% do peso fresco da planta utilizada (CARSON; RILEY, 1993) e sua composição química é complexa, apresentado-se como uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006; SILVA, N. et al., 2003). O óleo essencial das plantas de *M. alternifolia*, cultivadas na Austrália, caracteriza-se pela mistura aproximada de 97 compostos, a maioria já identificada. Os principais constituintes são os compostos terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p-cimeno e álcoois sesquiterpênicos, que representam cerca de 90% do óleo (BROPHY et al., 1989; MURTAGH; SMITH, 1996). Já no Brasil, Silva, N. et al. (2003) verificaram como constituintes químicos do óleo essencial de plantas cultivadas em Viçosa (MG): terpinen-4-ol (46,38%), p-cimeno (16,52%), γ -terpineno (9,74%), α -terpineol (4,35%) e 1,8-cineol (3,72%). As estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de *M. alternifolia* encontram-se na Figura 7.

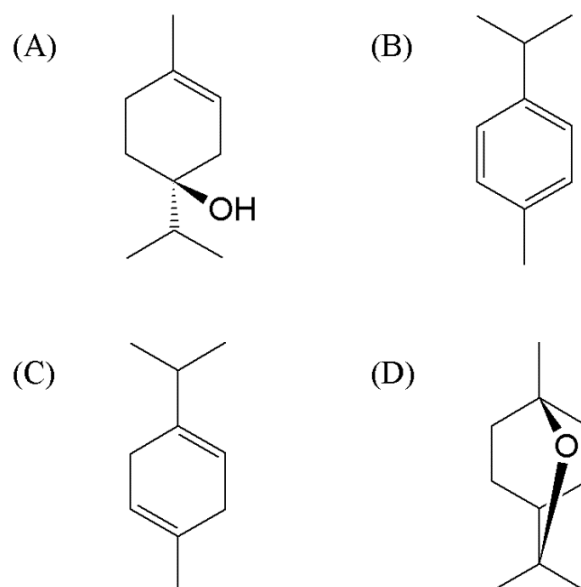


Figura 7 Constituintes majoritários do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*. (A) Terpinen-4-ol. (B) p-cimeno. (C) γ -terpineno. (D) 1,8-cineol

Em função de suas propriedades farmacológicas, o óleo essencial de *M. alternifolia* é utilizado em formulações farmacêuticas de vários produtos como xampus, sabonetes, cremes dentais, anti-sépticos bucais, repelentes de insetos, produtos veterinários, dentre outros (RIEDL, 1997). Possui comprovada ação antimicrobiana sobre bactérias e fungos filamentosos deteriorantes e/ou patogênicos, alguns vírus, microrganismos resistentes a antibióticos além de forte atividade repelente (CARSON; HAMMER; RILLEY, 2006; RIEDL, 1997; SILVA, N. et al., 2003). Silva, N. et al. (2003), por exemplo, verificaram, utilizando a técnica de difusão em disco, que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou atividade sobre microrganismos de interesse na indústria de alimentos: *S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *Enterococcus faecium*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*. Carson et al. (1995), por sua vez, testaram a atividade *in vitro* do óleo sobre 66 cepas de *S. aureus*, sendo 64 delas resistentes

à metilicina (MRSA). Observaram que todas as cepas foram sensíveis e 60 apresentaram Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 0,25% e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de 0,50%.

2.8.2 *Cymbopogon flexuosus* (D. C.) Stapf. (capim-limão da Índia Oriental)

O gênero *Cymbopogon* pertence à família Poaceae (Gramineae), sendo originário do Sul da Ásia, Sudeste Asiático e Austrália. Este gênero foi perfeitamente adaptado no Brasil e é comumente encontrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Maranhão e da Bahia ao Rio de Janeiro (MAY et al., 2008).

O capim-limão (*lemongrass*) apresenta duas espécies, com características diferentes. A primeira delas, de nome científico *C. flexuosus*, é conhecida como capim-limão da Índia Oriental ou capim-limão gigante (Figura 8), já o segundo, *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, é muito conhecido no Brasil como capim-limão, capim-cidreira, erva-cidreira, capim-santo, capim-cidrão, erva-cidreira, dentre outras denominações (LORENZI; MATOS, 2002). *C. flexuosus* é pouco conhecido e cultivado no Brasil (CASTRO; RAMOS, 2003).



Figura 8 Detalhe das folhas de *Cymbopogon flexuosus*.
Fonte: Lorenzi e Matos (2002)

Quando comparado ao óleo essencial de *C. citratus*, o óleo essencial de *C. flexuosus* apresenta maior teor de citral (CASTRO; RAMOS, 2003). Kumar et al. (2009) pesquisaram o teor de citral em 15 cultivares de *C. flexuosus* e constataram como valores máximos e mínimos de 92,04% e 82,87%, respectivamente. Chao et al. (2008) obtiveram como principais componentes do óleo essencial de *C. flexuosus* geranial (39,50%) e neral (29,5%), que isomericamente formam o citral, seguidos por geraniol (4,9%) e geranil acetato (2,5%). Oussalah et al. (2007) citam como principais compostos geranial (46%) e neral (31%). Anaruma et al. (2010) verificaram como constituintes majoritários do óleo essencial de *C. flexuosus* *trans*-geraniol (27,02%), citronelal

(23,30%), nerol (13,47%), geranial (12,60%) e neral (9,64%). As estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de *C. flexuosus* encontram-se na Figura 9.

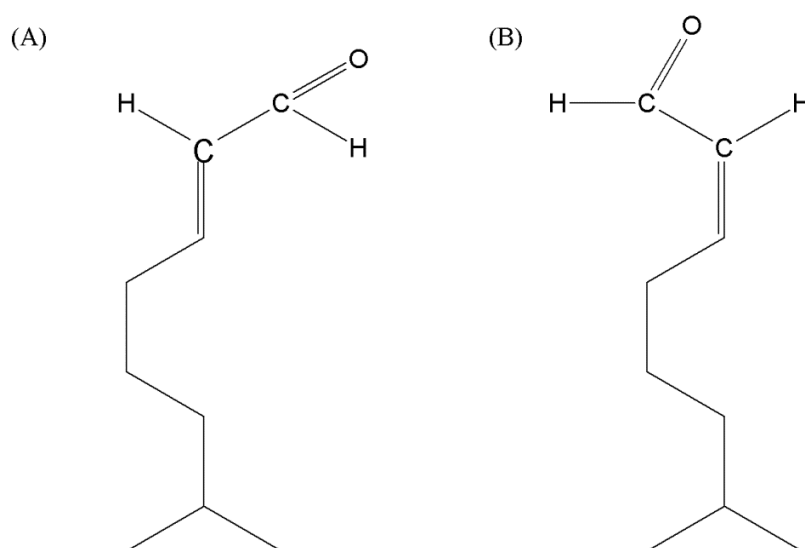


Figura 9 Constituintes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*.
(A) Neral. (B) Geranial

O óleo essencial de *C. flexuosus* vem apresentando grande demanda em todo o mundo. Este fato ocorre, em razão de sua variada gama de aplicações em diferentes tipos de indústrias, como de perfumaria e cosméticos, onde se destaca por seu aroma de limão; de alimentos e bebidas, onde é utilizado como condimento e/ou agente de conservação; na agricultura, como repelente de insetos; em sabões, detergentes e produtos farmacêuticos, por sua propriedade antimicrobiana; bem como na aromaterapia por suas propriedades curativas (BARATTA et al., 1998; KUMAR et al., 2009; LAWLESS, 1995).

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. flexuosus* já foi verificada *in vitro* contra diferentes espécies, como *E. coli* O157:H7, *Salmonella*

Typhimurium, *S. aureus* e *L. monocytogenes* (OUSSALAH et al., 2007). Chao et al. (2008) estudaram a atividade antibacteriana de 91 óleos essenciais contra *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) e verificaram que o óleo essencial de *C. flexuosus* promoveu a maior zona de inibição na técnica de difusão em ágar. Kumar et al. (2009) constaram o efeito antibacteriano do óleo essencial de *C. flexuosus* contra diversas bactérias, como *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já Kim, Marshall e Wei (1995) pesquisaram com sucesso a atividade antibacteriana do citral, principal constituinte do óleo essencial de *C. flexuosus*, contra *E. coli*, *E. coli* 0157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* e *Vibrio vulnificus*.

2.8.3 *Cinnamomum cassia* Blume (canela da China)

A canela é uma árvore originária da Ásia, cultivada há mais de quatro milênios pelos chineses. Pertence à família das Lauráceas, onde as duas espécies mais conhecidas são a canela do Ceilão (*Cinnamomum zeylanicum*) e a canela da China (*Cinnamomum cassia*), que se diferenciam por peculiaridades, como, por exemplo, a ausência de súber em *C. zeylanicum* e as concentrações de constituintes químicos, como o eugenol (BENARROZ, 2007), que se apresenta praticamente ausente em *C. cassia* (ARCHER, 1988).

C. cassia (Figura 10), também, chamada de falsa canela, é nativa da China, Indonésia, Laos e Vietnã (BISSET; WICHTL, 2001). É comumente utilizada na medicina chinesa para tratamento de dispepsia, gastrite, distúrbios da circulação e doenças inflamatórias. *C. cassia* é uma das especiarias mais antigas do mundo e vem sendo utilizada em indústrias de alimentos, bebidas e cosméticos. A parte da planta utilizada é a casca, de onde é extraído o óleo essencial, que pode ser encontrada em tubos, pequenos pedaços ou em pó (KWON; YU; PARK, 2003). O cinamaldeído é o componente majoritário do óleo essencial da casca de *C. cassia*. Ooi et al. (2006), por exemplo, encontraram

85,06% de trans-cinamaldeído no óleo essencial da casca de *C. cassia*. A estrutura química do principal constituinte do óleo essencial de *C. cassia* encontra-se na Figura 11.



Figura 10 *Cinnamomum cassia*. (A) Aspecto do cultivo. (B) Detalhe dos ramos, folhas e inflorescências

Fonte: Ribeiro e Diniz (2008)

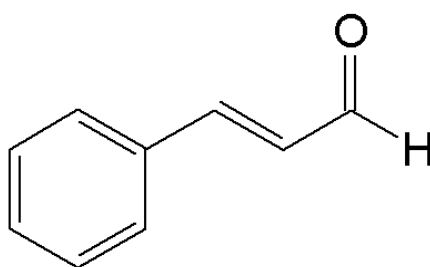


Figura 11 Cinamaldeído, constituinte majoritário do óleo essencial de *Cinnamomum cassia*

Quanto à atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. cassia*, diversos estudos já foram realizados e indicam grande potencial, tanto do óleo essencial em si, como do cinamaldeído individualmente. Ooi et al. (2006) verificaram que o óleo essencial de *C. cassia*, bem como o cinamaldeído puro, foram igualmente efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *S. Typhimurium*. Kwon, Yu e Park (2003) constataram que o cinamaldeído possui efeito bactericida e foi capaz de inibir a divisão celular quando testado contra *B. cereus*. Gill e Holley (2004) notaram rápida inibição do metabolismo energético de *L. monocytogenes* e *L. sakei* quando as células foram expostas a concentrações bactericidas de cinamaldeído. Os possíveis mecanismos responsáveis pela inibição da geração de energia bacteriana foram atuação na absorção e utilização de glicose e efeitos na permeabilidade da membrana citoplasmática.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos trabalhos consultados, tornam-se evidentes os prejuízos e riscos que biofilmes bacterianos podem ocasionar às indústrias de alimentos, bem como aos consumidores. Dentre as bactérias patogênicas capazes de aderir sobre superfícies de equipamentos e utensílios e, conseqüentemente, contaminar produtos alimentícios que passam pelo local, destacam-se *L. monocytogenes* e EPEC, pela sua presença constante em alimentos, como leite e seus derivados, e superfícies de indústrias de laticínios.

O estudo de novas alternativas de controle de biofilmes bacterianos é uma linha de pesquisa relativamente nova e em expansão. Dentre as opções mais recentemente propostas encontram-se os óleos essenciais e seus constituintes, alternativas promissoras para a elaboração de soluções sanitizantes naturais.

Neste contexto, estudos preliminares devem ser realizados para selecionar os óleos essenciais e constituintes mais efetivos contra as cepas bacterianas alvo. Por fim, estudos que busquem otimizar a concentração e o tempo de contato destas soluções devem ser conduzidos, com intuito de obter uma maior eficiência da ação antimicrobiana.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.
- AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 116, n. 3, p. 403-406, Mar. 2008.
- ALESSANDRIA, V. et al. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. S156-S162, July 2010. Supplement.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 10, p. 913-917, Oct. 2009.
- AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of *trans*-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 2, p. 200-208, Feb. 2011.
- ANANG, D. M. et al. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 961-969, Aug. 2007.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, Jan./Mar. 2010.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. de O.; ROSADO, M. S. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. (Ed.). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008a. p. 15-65.
- _____. Controle da higienização na indústria de alimentos. In: ANDRADE, N. J. (Ed.). **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008b. p. 181-226.

ANNOUS, B. A.; FRATAMICO, P. M.; SMITH, J. L. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 1, p. R24-R37, Jan./Feb. 2009.

ARAÚJO, V. S. et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, May 2002.

ARCHER, A. W. Determination of cinnamaldehyde, coumarin, and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 447, n. 1, p. 272-276, 1988.

AUSTIN, J. W.; BERGERON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 62, n. 3, p. 509-519, Aug. 1995.

AYALA-ZAVALA, J. F.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, L. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 7, p. R84-R91, Sept. 2009.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. The role of exopolymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* in biofilm formation and composition. **Biofouling**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 17-27, Apr. 2000.

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

BARATTA, M. T. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 13, n. 4, p. 235-244, Dec. 1998.

BEECH, I. B.; SUNNER, J. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 15, n. 3, p. 181-186, June 2004.

BENARROZ, M. de O. **Avaliação de efeitos de um extrato aquoso de *Cinnamomum zeylanicum* L. na marcação de constituintes sanguíneos com tecnécio-99m e na morfologia das hemácias de ratos wistar**. 2007. 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

BETTS, T. J. Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 936, n. 1/2, p. 33-46, Nov. 2001.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleos essenciais**. Curitiba: Layer, 2009. 160 p.

BISSET, N. G.; WICHTL, M. **Herbal drugs & phytopharmaceuticals**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 565 p.

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

BORUCKI, M. K. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7336-7342, Dec. 2003.

BOWLES, E. J. **The chemistry of aromatherapeutic oils**. 3rd ed. Sydney: Allen & Unwin Academic, 2004. 256 p.

BRANCO, M. A. de A. C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jul./dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 15**, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares anexas à presente. Brasília, 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_88.htm>. Acesso em: 5 mar. 2011.

_____. Portaria n. 122/DTN, de 29 de novembro de 1993. Inclui na Portaria nº 15, de 23/08/88, sub anexo 1, alínea I, o princípio ativo ÁCIDO PERACÉTICO, para uso das formulações de desinfetantes/esterilizantes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 131, n. 228, p. 18255, dez. 1993. Seção 1.

BRASIL. Resolução n. 211, de 18 de junho de 1999. Altera o texto do subitem 3 do item IV da Portaria 15 de 23 de agosto de 1988, que passa a ter a seguinte redação: “desinfetantes para indústrias em superfícies onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios, podendo utilizar, exclusivamente, os princípios ativos dos grupos C, D, E, F e H do SUBANEXO 1 e também a substância PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, v. 136, n. 116-E, p. 34, jun. 1999. Seção 1.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitana* from summer diarrhoea of infants. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 57, n. 2, p. 239-247, 1945.

BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 254-262, Feb. 2006.

BREYERS, J. D.; RATNER, J. P. Bioinspired implant materials befuddle bacteria. **ASM News**, Washington, v. 70, n. 5, p. 232-237, May 2004.

BRITO, J. R. F. et al. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 15, p. 4954-4961, Aug. 2008.

BROPHY, J. J. et al. Gas chromatography quality control for oil of melaleuca terpin-4-ol-type: Australian tea tree. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 5, p. 1330-1335, Sept. 1989.

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.

CAGRI-MEHMETOGLU, A. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. **Food Control**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 762-766, May 2011.

CARRIQUE-MAS, J. J. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese: an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, New York, v. 130, n. 1, p. 79-86, Feb. 2003.

CARSON, C. F. et al. Susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 421-424, Mar. 1995.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley, 2001. p. 203-238.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILLEY, T. V. *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 50-62, Jan. 2006.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 16, n. 1, p. 49-55, Feb. 1993.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 262-267, Mar. 2007.

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais:** *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack., capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. 31 p.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, set./dez. 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Investigation update:** multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen farms, Colorado. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/110211/index.html>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y. C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Malden, v. 12, n. 1, p. 1-55, Aug. 2004.

CHAO, S. et al. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 23, n. 6, p. 444-449, Nov./Dec. 2008.

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

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

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, Malden, v. 29, n. 1, p. 83-98, Jan. 2005.

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

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. 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**, Malden, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, June 2008.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, New York, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products: secondary metabolites. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

DALTON, C. B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 336, n. 2, p. 100-105, Jan. 1997.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 130-138, Jan. 2003.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. (Ed.). **Foodborne disease handbook**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2001. v. 1, p. 213-246.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Disease**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, Sept. 2002.

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

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 3, p. 1213-1219, Nov. 2003.

DUARTE, D. A. M. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set. 2005.

DUFFY, L. L. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Australian dairy powder factory environments. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 178-179, Mar. 2009.

FADEL, H. M.; ISMAIL, J. Prevalence and significance of *Staphylococcus aureus* and Enterobacteriaceae species in selected dairy products and handlers. **International Journal of Dairy Science**, New York, v. 4, n. 3, p. 100-108, 2009.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 162-165, dez. 2003. Suplemento.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, Dec. 2006.

FLEMMING, H. C. Biofilms and environmental protection. **Water Science and Technology**, London, v. 27, n. 7/8, p. 1-10, 1993.

FLEMMING, H. C.; WINDENGER, J. Extracellular polymeric substances (EPS): the biofilm construction material. In: WEBER, J.; SAND, W. (Ed.). **Biofouling and materials: COST 520 workshop**. Bern: EDMZ, 1999. p. 2-18.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant: description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 81-97, 1997.

FLINT, S. H. et al. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 90, n. 2, p. 151-157, Feb. 2001.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 424 p.

FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

FU, Y. J. et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 21, n. 10, p. 989-994, Oct. 2007.

GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A review: gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 98, n. 6, p. 1345-1353, June 2005.

GIBSON, H. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 87, p. 41-48, July 1999.

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

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, Oct. 2004.

GONZÁLEZ-MONTALVO, B. et al. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. **Meat Science**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 201-209, June 2007.

GRAM, L. et al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 2007.

GUSTAFSON, J. E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 26, p. 194-198, Mar. 1998.

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

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: THORMAR, H. (Ed.). **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. West Sussex: J. Wiley, 2011. p. 255-306.

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

HARMSSEN, M. et al. Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 7, p. 2271-2279, Apr. 2010.

HOFER, E. Três décadas de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: MERCADANTE, A. Z. et al. (Ed.). **Ciência de alimentos: avanços e perspectivas**. Campinas: UNICAMP, 2001. p. 111-115.

HOFER, E.; PÓVOA, M. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 45-93, jan./mar. 1984.

HOLAH, J. T. Industrial monitoring: hygiene in food processing. In: MELO, L. F. et al. (Ed.). **Biofilms: science and technology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1992. p. 645-659.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganism during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 2/3, p. 145-153, July 1997.

_____. Biofilms in food processing. **Food Control**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 9-18, 1995.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: I**, su significado e metodos de enumeracion. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, 439 p.

ITO, A. et al. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 12, p. 4093-4100, June 2009.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 265-269, June 2003.

KALOREY, D. R. et al. *Listeria* species in bovine raw milk: a large survey of Central India. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 109-112, Feb. 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 123-140, Feb. 2004.

KICH, J. D. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de seis diferentes desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 11, p. 33-39, 2004.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, Nov. 1995.

KIM, K. Y.; FRANK, J. F. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 1, p. 24-28, 1995.

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. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2008.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1/2, p. 9-27, June 1998.

KUMAR, S. et al. Differential citral content of 15 lemongrass genotypes and their anti microbial property. **The Internet Journal of Microbiology**, Georgetown, v. 6, n. 1, 2009. Disponível em: <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-6-number-1/differential-citral-content-of-15-lemongrass-genotypes-and-their-anti-microbial-property.html>. Acesso em: 15 jul. 2011.

KWON, J. A.; YU, C. B.; PARK, H. D. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Malden, v. 37, n. 1, p. 61-65, July 2003.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 2, p. 164-172, Feb./Mar. 2011.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 3, p. 229-233, June 2006.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, Barcelona, v. 9, p. 21-28, Mar. 2006.

LAWLESS, J. **The illustrated encyclopedia of essential oils**. Rockport: Element Books, 1995. 132 p.

LEBERT, I.; LEROY, S.; TALON, R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 3, p. 281-287, May 2007.

LEHNER, A. et al. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signalling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 11, p. 2287-2294, Nov. 2005.

LINDSAY, D.; HOLY, A. von. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, London, v. 14, n. 4, p. 383-390, Aug. 1997.

LOMANDER, A. et al. Evaluation of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. **Bioresources Technology**, Raleigh, v. 94, n. 3, p. 275-283, Sept. 2004.

LOMONACO, S. et al. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 516-520, Jan. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis and food safety**. 2nd ed. New York: M. Dekker, 1999. p. 131-224.

MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, Oct. 2007.

MATTILA-SANDHOLM, T.; WIRTANEN, G. Biofilm formation in the food industry: a review. **Food Reviews International**, Philadelphia, v. 8, n. 4, p. 573-603, 1992.

MAUKONEN, J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 30, n. 6, p. 327-356, June 2003.

MAY, A. et al. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 379-382, jul./set. 2008.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-625, Oct. 1999.

MELO, L. F. Biofilmes e o controle da poluição. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 48, n. 1, p. 16-25, 1994.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, Malden, v. 97, n. 2, p. 262-270, Aug. 2004.

_____. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4015-4024, Aug. 2002.

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

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 107-121, 2004.

MOSTELLER, T. M.; BISHOP, J. R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 1, p. 34-41, Jan. 1993.

MURTAGH, G. J.; SMITH, G. R. Month of harvest and yield components of tea tree: II., oil concentration, composition, and yield. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 47, n. 5, p. 817-827, May 1996.

NASCIMENTO, D.; SABIONI, J. G.; PIMENTA, N. Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasora (EIEC) em queijo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto, MG. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 258-261, jul./set. 1988.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142-201, Jan. 1998.

NERO, L. A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 1, p. S3-S15, May 2010. Supplement.

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, Mar./Apr. 2007.

OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, New York, v. 102, n. 9, p. 852-856, Sept. 2008.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M. de et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

_____. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 2, n. 2, p. 115-129, 2005.

OOI, L. S. M. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **American Journal of Chinese Medicine**, Singapore, v. 34, n. 3, p. 511-522, 2006.

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

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 178-185, Feb. 2008.

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

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

PEREIRA, M. O. P. de O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. 2001. 234 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga, 2001.

PÉREZ-CONESA, D. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 1, p. 55-62, Jan. 2011.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, Washington, v. 311, n. 5762, p. 808-811, Feb. 2006.

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

PORTNOY, D. A.; AUERBUCH, V.; GLOMSKI, I. J. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 158, n. 3, p. 409-414, Aug. 2002.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 6, n. 39, Nov. 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/39/prepubbyours>>. Acesso em: 12 jun. 2011.

PROSSER, L. T. et al. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 31, n. 10, p. 1502-1506, Oct. 1987.

RIBEIRO, P. G. F.; DINIZ, R. C. **Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização**. Londrina: IAPAR, 2008. 218 p.

RICKARD, A. H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends in Microbiology**, London, v. 11, n. 2, p. 94-100, Feb. 2003.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992. 320 p.

RIEDL, R. W. Practical methods for using tea tree oil. **Agro-Food Industry Hi-Tech**, Ballina, v. 8, p. 34-36, Sept./Oct. 1997.

RIEU, A. et al. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1/2, p. 76-82, Aug. 2008.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 263-272, abr. 2006.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, listeriosis, and food safety**. New York: M. Dekker, 1999. p. 1-20.

SAINZ, T. et al. Survival to different acid challenges and outer membrane protein profiles of pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pozol, a Mexican typical maize fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 357-367, Dec. 2005.

SALUSTIANO, V. C. et al. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 439-442, Apr. 2009.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 262-269, abr./jun. 2009.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. p. 403-434.

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, Washington, v. 2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States: major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 1, p. 7-15, Jan. 2011.

SEVERINO, P. **O programa transcricional de *Listeria monocytogenes*: considerações sobre adaptação ao meio ambiente e sobre a regulação da expressão de genes de virulência.** 2006. 205 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry: a case. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 6/7, p. 469-477, Sept./Oct. 2002.

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

SIHORKAR, V.; VYAS, S. P. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 18, n. 9, p. 1254-1427, Sept. 2001.

SILVA, I. M. M. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, Mar. 2003.

SILVA, N. J. et al. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Malaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 63-70, 2003.

SILVA, R. et al. Pasteurized milk: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 217-219, Feb. 2010.

SILVA, Z. N. de et al. Isolation and serological identification of enteropathogenic *Escherichia coli* in pasteurized milk in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 375-379, ago. 2001.

SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 84, n. 4, p. 338-345, Dec. 2006.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, Zurich, v. 43, n. 4, p. 573-583, May 2010.

_____. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. **Water Research**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 229-227, Jan. 2009.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In: _____. **Proceedings of the international conference processes in biofilms: fundamentals to applications**. Davis: CRC, 2009. p. 58-62.

SOLOMAKOS, N. et al. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 120-127, Feb. 2008.

SOUZA, E. L. de et al. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 387-393, Apr./June 2009.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 111-117, abr./jun. 2005.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 292, n. 2, p. 107-113, Apr. 2002.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, n. 1, p. 187-209, Oct. 2002.

_____. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed species biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5608-5613, Dec. 2001.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2nd ed. Washington: ASM, 2001. p. 383-409.

TEBALDI, V. M. R. et al. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 3, p. 753-760, jul./set. 2008.

THEERTHANKAR, D. et al. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 10, p. 3405-3408, May 2010.

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 109, n. 10, p. 1597-1608, Oct. 1989.

TRABULSI, L. R. et al. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 1-6, 1996. Supplement.

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

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, jul./set. 2009.

TRONCO, V. M. **Manual para a inspeção da qualidade do leite**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2003. 192 p.

TSUNEDA, S. et al. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 223, n. 2, p. 287-292, June 2003.

UNNERSTAD, H. et al. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, Oxford, v. 50, n. 4, p. 493-499, 1996.

VALLIN, V. M. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, jan./mar. 2009.

VANEGAS, M. C. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 430-432, Apr. 2009.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne pathogens**. London: Wolfe, 1991. 557 p.

VEEN, S. van der; ABEE, T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 421-431, Jan. 2011.

VERRAN, J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 80, n. 4, p. 292-298, Dec. 2002.

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

VIDAL, J. E. et al. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud Pública de México**, Morelos, v. 49, n. 5, p. 376-386, 2007.

VIEIRA, M. J.; MELO, L.; PINHEIRO, M. M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 67-80, 1993.

VLKOVÁ, H. et al. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms: a review. **Czech Journal of Food Sciences**, Praha, v. 26, n. 5, p. 309-323, 2008.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, July 2002.

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

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

WEIQIN, Z. et al. Taqman fluorescent quantitative PCR detection of EPEC in raw milk. **China Dairy Industry**, Harbin, v. 37, n. 10, p. 53-55, Oct. 2009.

WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, Jena, v. 8, n. 5, p. 401-409, Sept. 2001.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 7, p. 727-733, July 1996.

WIRTHLIN, M. R.; CHEN, P. K.; HOOVER, C. I. A laboratory model biofilm fermenter: design and initial trial on a single species biofilm. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 76, n. 9, p. 1443-1449, Sept. 2005.

XU, K. D.; MCFETERS, G. A.; STEWART, P. S. Biofilm resistance to antimicrobial agents. **Microbiology**, New York, v. 146, n. 3, p. 547-549, Mar. 2000.

YOSHIDA, T. et al. Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 60, n. 10, p. 1165-1168, Oct. 1998.

YUCEL, N.; ULUSOY, H. A Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. **Food Control**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 383-388, May 2006.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. da. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, maio/jun. 2007.

ZEGARRA, J. J. Q. et al. Pesquisa de microrganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 1, p. 312-321, 2009.

ZOBELL, C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 39-56, July 1943.

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

SEGUNDA PARTE

ARTIGOS

ARTIGO 1

Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils

Versão preliminar submetida ao periódico *Food and Bioproducts Processing*,
sendo preparada de acordo com suas normas de publicação.

Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils

Maíra Maciel Mattos de Oliveira *, Danilo Florisvaldo Brugnera, Josianne Arantes do Nascimento, Roberta Hilsdorf Piccoli

Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 35 3829 1392; fax: +55 35 3829 1401.

E-mail addresses: mmacielmattos@yahoo.com.br (M.M.M. de Oliveira), daniolobrugnera@hotmail.com (D.F. Brugnera), josi.arantez@hotmail.com (J.A. do Nascimento), rhpiccoli@dca.ufla.br (R.H. Piccoli).

ABSTRACT

The antibacterial potential of essential oils (EOs) from *Cinnamomum cassia* bark and *Melaleuca alternifolia* and *Cymbopogon flexuosus* leaves was evaluated in planktonic and sessile cells of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes*. The EOs were tested singly and in different combinations of equal proportions. The initial tests implicated the EO of *C. cassia* as potential candidate, and their effect was studied on sessile cells after the formation of biofilms under stirred and static conditions. In the assays on stainless steel coupons of both bacterial species, a 2% (v/v) solution of the EO from *C. cassia* was effective at wholly eliminating viable bacterial cells after biofilm formation under static conditions. Although the biofilm of *L. monocytogenes* showed a decreased number of adhered cells under stirring conditions ($p < 0.05$), it was surprisingly more resistant to the EOs of *C. cassia* than the biofilm formed under static conditions ($p < 0.05$). All of the EOs and combinations tested presented a certain degree of antibacterial activity against planktonic cells, however, the EO of *C. cassia* showed the most promise as a potential agent for the production of sanitizers for biofilm control in food industries.

Keywords: *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; Bacterial biofilms; Natural sanitizers; Essential oils; *Cinnamomum cassia*

1. Introduction

There are over 200 microbial, chemical or physical agents that are capable of causing diseases when ingested (Acheson, 1999). At present, food-borne bacterial agents are the most well studied and monitored causes of intestinal infectious diseases (Newell et al., 2010). *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* are one of the most frequently involved bacterial species in food-borne diseases (Newell et al., 2010; Scallan et al., 2011).

Strains of intestinal disease-causing *E. coli*, including enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAaggEC), diffusely adhering *E. coli* (DAEC) and verotoxigenic *E. coli* (VTEC) or shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), were isolated and separated into at least six different groups of diarrheagenic *E. coli* (DEC) on the basis of specific virulence factors and phenotypic characteristics (Newell et al., 2010). The EPEC are characterized by their ability to colonize the intestinal mucosa and produce attaching and effacing (A/E) lesions known as (Chen and Frankel, 2005). In addition, the EPEC are found in foods, such as cheese (Araújo et al., 2002) and raw milk (Altalhi and Hassan, 2009), and are related to outbreaks of food-borne infections (Ibrahim et al., 2007).

L. monocytogenes is the causal agent of listeriosis, a food-borne infection that occurs mainly in elderly people, pregnant women, newborn babies and immunocompromised individuals; in its invasive form, *L. monocytogenes* is able to cause death in 25-30% of cases (Doganay, 2003; Watson, 2009). Classified as a psychrotrophic bacteria and able to survive the adverse conditions found in food industries, such as high salt and low pH and water activity (Lado and Yousef, 2006). Because of their ubiquitous distribution in nature, these bacteria were originally discovered in foods of animal (Lomonaco et al., 2009; Pesavento et al., 2010) and vegetal (Cordano and Jacquet, 2009)

origins and have been involved in a number of outbreaks of food-borne infections (Koch et al., 2010; Jackson et al., 2011).

The source of microbiological contamination in food might be the formation of microbial biofilms as a result of the insufficient hygienization of equipment and utensils. The cells on biofilm are more resistant to cleaning and sanitization procedures than planktonic bacteria, which makes their elimination a great challenge (Shi and Zhu, 2009; Simões et al., 2010). Thus, the study of new tools for the control and eradication of bacterial biofilms has become a new research interest. One of the more promising and natural alternatives is the use of essential oils (EOs) or of their constituents as antibacterial agents (Oliveira et al., 2010a; Amalaradjou and Venkitanarayanan, 2011).

EOs, including those of *Cinnamomum cassia* bark (Chinese cinnamon) and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and *Cymbopogon flexuosus* (lemongrass) leaves, are known for their antibacterial activity on planktonic cells (Burt, 2004; Oussalah et al., 2007; Bakkali et al., 2008) and therefore are excellent options for the development of sanitizing solutions. Thus, there has been an emphasis on the combinatorial use of EOs from different plant species to uncover a synergistic antibacterial action. Research conducted *in vitro* on planktonic cells have shown promising results (Fu et al., 2007; Oliveira et al., 2011), which demonstrates that this is an interesting alternative to be tested in the control of microbial biofilms. The focus of this study was to evaluate the antibacterial activity of the EOs of *C. cassia*, *C. flexuosus* and *M. alternifolia*, either single or in combination in the planktonic and sessile cells of EPEC and *L. monocytogenes*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial species utilized, standardization, storage and inoculum preparation

Listeria monocytogenes ATCC 19117 (serotype 4d) was purchased from the Culture Collection Section of the Medical Biology Division of the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, São Paulo, Brazil). EPEC CDC O126 was provided by the Reference Materials Laboratory of the National Institute of Quality Control in Health of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil).

For the standardization, the strains were inoculated in 150 mL of Tryptone Soya Broth (TSB), which was incubated at 37 °C. The growth curves were determined by performing periodic absorbance readings (600 nm) and serial dilutions in 0.1% peptone water (m/v). Then, from the peptone water, and using Tryptone Soya Agar (TSA) as culture medium, spread plating methodology was improved to determine the Log CFU/mL.

The strains were frozen at -18 °C in TSB containing 20% (v/v) glycerol. For utilization, an aliquot of cells was transferred to a test tube containing TSB and incubated at 37 °C for 24 hours. Subsequently, the culture was transferred to 150 mL of TSB and incubated at 37 °C until the culture reached the required cell density. For *L. monocytogenes*, an absorbance of 0.895 corresponded to 9.17 Log CFU/mL, and for EPEC, an absorbance of 1.217 corresponded to 9.09 Log CFU/mL. Dilutions were performed in an appropriate substrate to obtain the desired concentrations.

2.2. EOs

The EOs of *C. cassia* bark and *C. flexuosus* and *M. alternifolia* leaves were purchased from Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil). The primary components of the EOs, as specified by the technical appraisal of the supplying company, were cinnamic aldehyde (81%)

for *C. cassia*; citral (70%) for *C. flexuosus*; and terpinen-4-ol (40%), γ -terpinene (22.3%), α -terpinene (10.8%) and cineol (3%) for *M. alternifolia*.

2.3. Antibacterial activity of the EOs on the planktonic cells

The EOs were tested singly and in different combinations of equal proportions (mixtures of two and three EOs), totaling seven different experimental conditions.

2.3.1. Screening

The agar diffusion technique (adapted from Gulluce et al., 2007) was employed. Aliquots (100 μ L) of TSB containing the bacterial culture (8 Log CFU/mL) were deposited onto the surface of the Petri dishes (90 mm in diameter) containing approximately 20 mL of TSA and spread using a Drigalski loop until the culture was completely absorbed. A volume of 0.5% (v/v) Tween 80 was previously added to the TSA. For *L. monocytogenes*, the culture medium was supplemented with 0.6% (m/v) yeast extract (TSA-YE). Filter paper discs (6 mm in diameter) were placed on the surface of the culture medium at the center of the dish. The EOs and their combinations were added (6 μ L) to the filter paper discs, and the dishes were sealed with polyvinyl chloride film (PVC) and incubated at 37 °C for 24 hours. The inhibition zones surrounding the filter paper discs were measured using a digital paquimeter. The average of two diametrically opposite measurements was calculated, and the result was expressed in millimeters (mm).

2.3.2. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs)

Broth microdilution was utilized. The bacterial species, EPEC and *L. monocytogenes*, were cultured in TSB and TSB supplemented with 0.6% (m/v) of yeast extract (TSB-YE), respectively. The following concentrations of EOs

were prepared in flat-bottomed 96-well polystyrene microplates: 0.00; 0.01; 0.03; 0.06; 0.12; 0.25; 0.50 and 1.00% (v/v). These concentrations were obtained by homogenizing the EOs or their combinations in the specified culture medium, containing 0.5 % (v/v) Tween 80 in a final volume of 150 μ L per well. The bacterial inoculum (8 Log CFU/mL) was added to the wells at a volume of 10 μ L. Three repetitions were performed. For all concentrations, wells were prepared without the bacterial inoculum, containing only the EOs diluted in the culture medium. The microplates were capped and incubated at 37 °C for 24 hours. The absorbance was measured at 620 nm in microplate reader (Anthos 2010) prior to the incubation (time zero) and after 24 hours. From the absorbance value obtained at 24 hours was subtracted the reading of the time zero, discounting from the same ones the absorbance concerning the culture medium and EOs. The MICs corresponded to the lowest concentrations of EOs that resulted in the complete inhibition of bacterial growth.

2.4. Antibacterial activity of the EOs on sessile cells

2.4.1. Polystyrene microplate assays

Initially, we evaluated the ability of each bacterial species to form a biofilm in flat-bottomed 96-well polystyrene microplates. TSB or TSB-YE, depending on the bacteria utilized, was added at a volume of 150 μ L, and the bacterial inoculums (8 Log CFU/mL) were added at a volume of 50 μ L. Negative controls were represented by wells containing only 200 μ L of the substrates. Eight repetitions for each experiment were performed. The incubation was performed at 37 °C for 48 hours. Subsequently, the liquid was aspirated, and the wells were washed three times with a 0.85% saline solution (m/v). The sessile cells were stained with crystal violet (0.1% m/v, in sterile distilled water) at a volume of 200 μ L. After 10 minutes, the crystal violet was removed and the wells were washed with saline solution. After drying for 1 hour, 200 μ L of 95% ethanol

(v/v) was added to detach the biofilms. After 10 minutes, the content of the wells was homogenized and transferred to a new microplate, and the absorbance was read (620 nm) (adapted from Merritt et al., 2005). The following classification was utilized: biofilm non-formers ($Doa \leq Docn$), weakly formed biofilm ($Docn < Doa \leq 2 \times Docn$), moderately formed biofilm ($2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$) and strongly formed biofilm ($4 \times Docn < Doa$). Doa is the optical density of the biofilm, and Docn is the optical density of the negative growth control (Stepanović et al., 2000).

To evaluate the susceptibility of the bacterial biofilms to the EOs, 150 μ L of TSB for EPEC or TSB-YE for *L. monocytogenes* was added to flat-bottomed 96-well polystyrene microplates. The bacterial inoculum (8 Log CFU/mL) was added at a volume of 50 μ L per well. The incubation was performed at 37 °C for 48 hours to allow biofilm formation. The culture media was removed, and the wells were washed three times with saline solution to remove the non-adhered cells. Similar to the evaluation of the antibacterial activity against planktonic cells, the EOs were tested singly and in different combinations of equal proportions (mixtures of two and three EOs), totaling seven different experimental conditions. The EOs and their combinations were added to microtubes containing saline solution with 0.5% (v/v) Tween 80 and homogenized by vortexing until complete dissolution (approximately 2 minutes). The following concentrations of EOs were obtained: 0.00; 0.01; 0.03; 0.06; 0.12; 0.25; 0.50 and 1.00% (v/v). The EO solutions were added (200 μ L) to the wells, and the samples were maintained for 20 minutes at room temperature. Subsequently, the wells were washed three times with saline solution to remove any residual EO. The appropriate culture medium (TSB or TSB-YE) was added at a volume of 200 μ L to each well, and the microplates were incubated at 37 °C for 24 hours. Three repetitions were performed. The absorbance was measured at 620 nm prior to the incubation (time zero) and after

24 hours. The results were obtained by subtracting the reading at time zero from the value obtained after the incubation period.

2.4.2. Stainless steel coupon assays

Stainless steel coupons AISI 304 (#4) (1 x 8 x 18 mm) were previously hygienized and sterilized according to Rossoni and Gaylarde (2000), as cited by Oliveira et al. (2010a, 2010b). The coupons were arranged in Petri dishes (150 mm in diameter), and 60 mL of either TSB or TSB-YE containing the bacterial inoculum (8 Log CFU/mL) was added. The incubation was conducted at 37 °C for 48 hours and under static conditions. Subsequently, the coupons were removed, washed three times with saline solution to remove the non-adhered cells and submitted to the following treatments: 1 and 2% (v/v) *C. cassia* EO diluted in saline solution containing 0.5% (v/v) Tween 80 and 0.5% (v/v) solution of a commercial chemical sanitizer based on alkyltrimethylbenzylammonium chloride (Diprol bactericide A-764). The EO of *C. cassia* was the most effective for inhibiting the growth of both bacterial species in previous assays. The treatments were maintained for 20 minutes at room temperature under static conditions. The coupons were washed three times in a saline solution to remove residual EOs or chemical sanitizer. The sessile cells were collected using swabs, transferred to 10 mL of peptone water and stirred in a vortex for 2 minutes. The sessile cells that were not submitted to any treatment were also removed from the coupons, which represented the biofilm count. Serial dilutions of up to 10^{-4} were performed in 9 mL of peptone water. Plating was performed in triplicate using the microdrop technique (10 μ L). The bacteria were cultured in TSA or TSA-YE according to the bacterial species. The incubation was performed at 37 °C for 14 hours.

To verify the influence of stirring on the formation of the bacterial biofilms and their susceptibility to the EO of *C. cassia*, an additional experiment

was performed where Petri dishes containing the stainless steel coupons and the bacterial inoculum were submitted or not to stirring at 50 rpm during the incubation period. The number of adherent viable cells on the stainless steel coupons was determined before and after the treatment with 2% (v/v) *C. cassia* EO. The formation of the biofilm, treatment with EO solution, removal of the sessile cells and microbiological analysis was conducted in the same way as discussed in the previous paragraph.

2.5. Experimental designs and statistical analyses

For the screening step a 2 x 7 (bacterial species x EOs or their combinations) factorial scheme in a Completely Randomized Design (CRD) was performed in three repetitions, and significant differences ($p < 0.05$) were calculated using the variance analysis (ANOVA). The averages were compared by the Scott-Knott test at a 5% probability. The response variable was represented by the diameter of the inhibition halos in mm.

The CRD was also utilized for the stainless steel coupon assays under static conditions and for evaluation of the influence of stirring in the formation of the bacterial biofilms and their susceptibility to the EO solution. Each bacterial species was analyzed individually. The experiments were performed in three repetitions, and significant differences were detected ($p < 0.05$) using the variance analysis (ANOVA). The means were compared by the Scott-Knott test at a 5% probability. The response variable was expressed in Log CFU/cm².

The Sisvar *software* version 4.6 was utilized.

3. Results and discussion

3.1. Antibacterial activity of the EOs on planktonic cells

The agar diffusion technique revealed that for *L. monocytogenes*, the EOs with higher and lower antibacterial action ($p < 0.05$) were from *C. cassia* and *M.*

alternifolia, respectively. For EPEC, the largest inhibition halos ($p < 0.05$) were found for the combination *C. cassia* + *M. alternifolia* and for *C. cassia* alone, while the smallest inhibition halos ($p < 0.05$) were obtained when *C. flexuosus* and *M. alternifolia* were used in combination or singly. For bacteria species, no synergistic effects were observed using a combination of EOs from distinct species ($p > 0.05$). Synergistic effects are characterized by an increase of the effects of these compounds when they are utilized in combination. We also observed that EPEC was more resistant to the EOs and their combinations compared with *L. monocytogenes* ($p < 0.05$). This observation was consistent for all of the experimental conditions, with the exception of the EO of *M. alternifolia*, where *L. monocytogenes* was more resistant ($p < 0.05$) and for the combination of *C. flexuosus* + *M. alternifolia*, for which there were no differences ($p > 0.05$) among the bacterial species (Table 1).

Table 1 - Average diameter of the inhibition halos formed by the antibacterial activity of essential oils (EOs) and their combinations on enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes*.

EOs and their combinations	EPEC	<i>L. monocytogenes</i>
<i>M. alternifolia</i>	5.50 ± 0.61^{Aa}	1.94 ± 0.23^{Ba}
<i>C. flexuosus</i> + <i>M. alternifolia</i>	5.05 ± 0.57^{Aa}	7.88 ± 1.26^{Ab}
<i>C. flexuosus</i>	7.00 ± 1.27^{Aa}	17.15 ± 4.69^{Bc}
<i>C. cassia</i> + <i>C. flexuosus</i> + <i>M. alternifolia</i>	9.85 ± 0.41^{Ab}	16.86 ± 2.56^{Bc}
<i>C. cassia</i> + <i>C. flexuosus</i>	11.51 ± 1.76^{Ab}	18.37 ± 0.53^{Bc}
<i>C. cassia</i> + <i>M. alternifolia</i>	14.68 ± 1.43^{Ac}	18.23 ± 0.43^{Bc}
<i>C. cassia</i>	13.72 ± 1.76^{Ac}	22.42 ± 0.08^{Bd}

The results are expressed as the average of three repetitions of the diameters of the inhibition halos in millimeters (mm) $\pm$ the standard deviation. The equivalent capital letters in the rows and the lowercase letters in the columns do not differ as determined by the Scott-Knott test at 5% probability. In combination, the EOs were used in equal proportions.

The smallest MIC for *L. monocytogenes* was ascribed to the EO of *C. cassia*, while the greatest was obtained when the EO of *M. alternifolia* (Table 2)

was utilized. This result is consistent with that obtained in the agar diffusion technique (Table 1), which demonstrates the compatibility of these two methodologies for evaluating the antimicrobial activity of EOs *in vitro*. For EPEC, the smallest MIC was obtained when the EO of *C. cassia* was tested, and the greatest MICs were obtained when the EOs of *C. flexuosus* and *M. alternifolia* were tested (Table 2). This result is consistent with that obtained using agar diffusion (Table 1), which emphasizes that *screening* is an effective and practical manner for selecting EOs or combinations with increased antibacterial effect.

The MICs of the EOs and their combinations obtained for EPEC were generally higher than those obtained for *L. monocytogenes*, which again demonstrates the highest resistance of the Gram-negative species utilized. For EPEC, the combination of the EOs of *C. flexuosus* and *M. alternifolia* enhanced their individual efficiency, and a decreased MIC value was observed (Table 2).

Table 2 - Minimum inhibitory concentration (MICs) in % (v/v) of the essential oils (EOs) and their combinations on enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes*.

EOs and their combinations	EPEC	<i>L. monocytogenes</i>
<i>M. alternifolia</i>	0.25	0.50
<i>C. flexuosus</i> + <i>M. alternifolia</i>	0.12	0.12
<i>C. flexuosus</i>	0.25	0.12
<i>C. cassia</i> + <i>C. flexuosus</i> + <i>M. alternifolia</i>	0.12	0.12
<i>C. cassia</i> + <i>C. flexuosus</i>	0.12	0.06
<i>C. cassia</i> + <i>M. alternifolia</i>	0.12	0.06
<i>C. cassia</i>	0.06	0.03

When in combination, the EOs were used in equal proportions.

The differences among the antibacterial activities of EOs of distinct plant species can be ascribed to the chemical compositions of secondary metabolites. In general, what is found in the literature is that the phenylpropanoid-rich EOs are more active against microorganisms

(Prabuseenivasan et al., 2006; Oussalah et al., 2007). An example of this fact is observed with the EO of *C. cassia*, a prominent chemical used in this study due to its high antibacterial activity against planktonic cells, in which the cinnamic aldehyde may reach concentrations above 80% (Ooi et al., 2006). The antibacterial activity of EOs obtained from the bark of plants of the genus *Cinnamomum*, such as *C. cassia*, *C. zeylanicum* and *C. verum*, has previously been demonstrated *in vitro* on different species of pathogenic bacteria with importance to food microbiology, such as Gram-positive and Gram-negative bacteria, including *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Ooi et al., 2006; Gupta et al., 2008; Unlu et al., 2010).

Other factors that impact the antibacterial activity of EOs are the characteristics of the bacterial species on which they act. Normally, Gram-negative bacteria, such as EPEC, are more resistant than the Gram-positive ones because their outer membrane serves as an additional barrier, making the diffusion of the constituents of the EOs into the bacterial cell difficult (Mann et al., 2001; Burt, 2004). The nucleus and the O antigen in the lipopolysaccharide of the outer membrane of Gram-negative bacteria have a hydrophilic nature, which prevents the accumulation of EOs in the bacterial cytoplasmic membrane (Bezic et al., 2003). The EOs are typically lipophilic compounds and, therefore, are capable of diffusion through the cell wall and cytoplasmic membrane, causing an increase in the damage of the structure of different layers of polysaccharides, fatty acids and phospholipids (Bakkali et al., 2008) as a result of permeability. The mechanism of the EOs in the bacterial cells is complex and diversified and includes the destruction of the cell wall and cytoplasmic membrane, damage to the membrane proteins, release of the cell content, depletion of the proton motive force, cytoplasm coagulation, inactivation of essential enzymes and disturbance of the functionality of genetic material (Burt,

2004, Ayala-Zavala et al., 2009). Recently, Di Pasqua et al. (2010) discovered, through proteomic analyses, that phenylpropanoid thymol altered different metabolic pathways in *Salmonella enterica* serovar Thompson.

3.2. Antibacterial activity of the EOs on sessile cells

Both of the bacterial strains utilized were capable of adhering and forming biofilm on the polystyrene surface. EPEC was classified as a strong biofilm former and *L. monocytogenes* was a moderate biofilm former. Rodrigues et al. (2010) verified that isolates of *L. monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *E. coli*, isolated from a poultry slaughterhouse, were capable of forming biofilms at different intensities in TSB on the surface of polystyrene microplates. The majority of the isolates of the genus *Listeria* presented themselves as weakly or moderately capable of forming biofilm, while those of *E. coli* were weakly, moderately or strongly capable of forming biofilm. According to the authors, the capacity for forming biofilm can affect the persistence of bacteria in food processing plants, which consequently affects microbiological contamination risks, compromising consumers' health.

The sessile cells were more resistant to the natural antibacterial products than were the planktonic cells, and only the most elevated concentrations of some EOs or combinations reduced the viability of the bacteria present in the biofilms. Nevertheless, the antibacterial behavior of the EOs and their applications on sessile cells was similar to that on the planktonic cells. For *L. monocytogenes*, the EO of *C. flexuosus* at 0.5 and 1.0% (v/v) caused the highest reduction in bacterial growth, followed by the combination *C. cassia* + *C. flexuosus* and *C. cassia* alone, which were also effective at the highest concentrations (0.5 and 1.0% v/v). The other combinations of EOs showed some antilisterial effects against the bacterial cells on the biofilm at the highest concentration (1.00% v/v), and the EO of *M. alternifolia*, when utilized singly,

was not effective. EPEC was more resistant than the Gram-positive species utilized, and at 1.00% (v/v) the antimicrobial action of the *C. cassia* EO is prominent, followed by the combination of *C. cassia* + *C. flexuosus* and *C. flexuosus* when utilized singly. *M. alternifolia* and the combination of the three EOs demonstrated no effect against the biofilm of EPEC (Fig. 1 and Fig. 2).

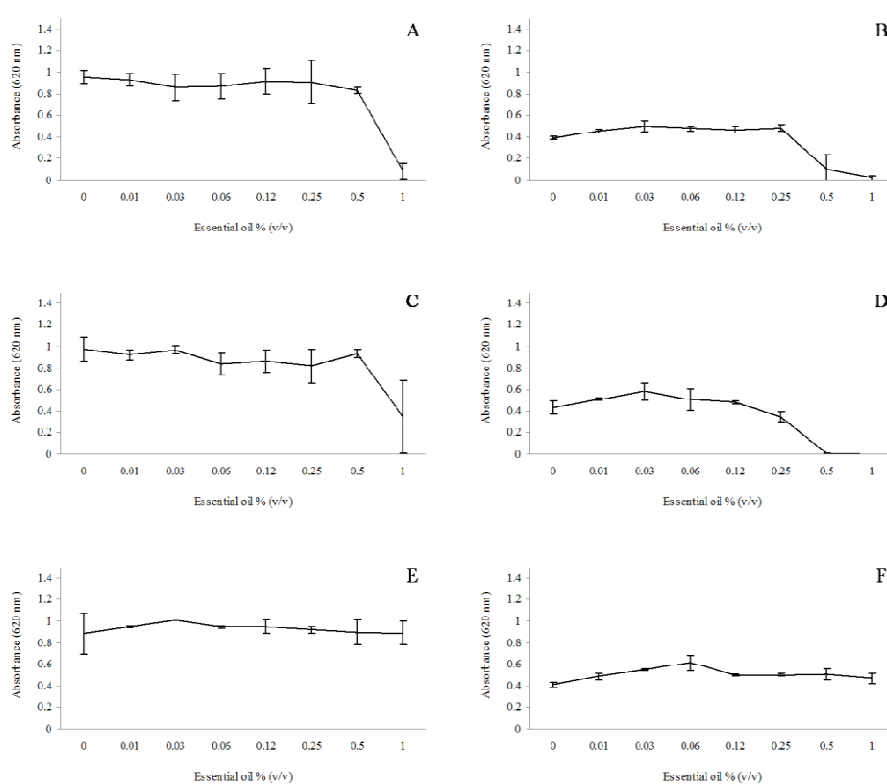


Fig. 1 - Antibacterial activity of different concentrations of essential oils on sessile cells. The results are equivalent to the average of three repetitions, and the error bars represent the standard deviation. A) *Cinnamomum cassia* and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). B) *C. cassia* and *Listeria monocytogenes*. C) *Cymbopogon flexuosus* and EPEC. D) *C. flexuosus* and *L. monocytogenes*. E) *Melaleuca alternifolia* and EPEC. F) *M. alternifolia* and *L. monocytogenes*.

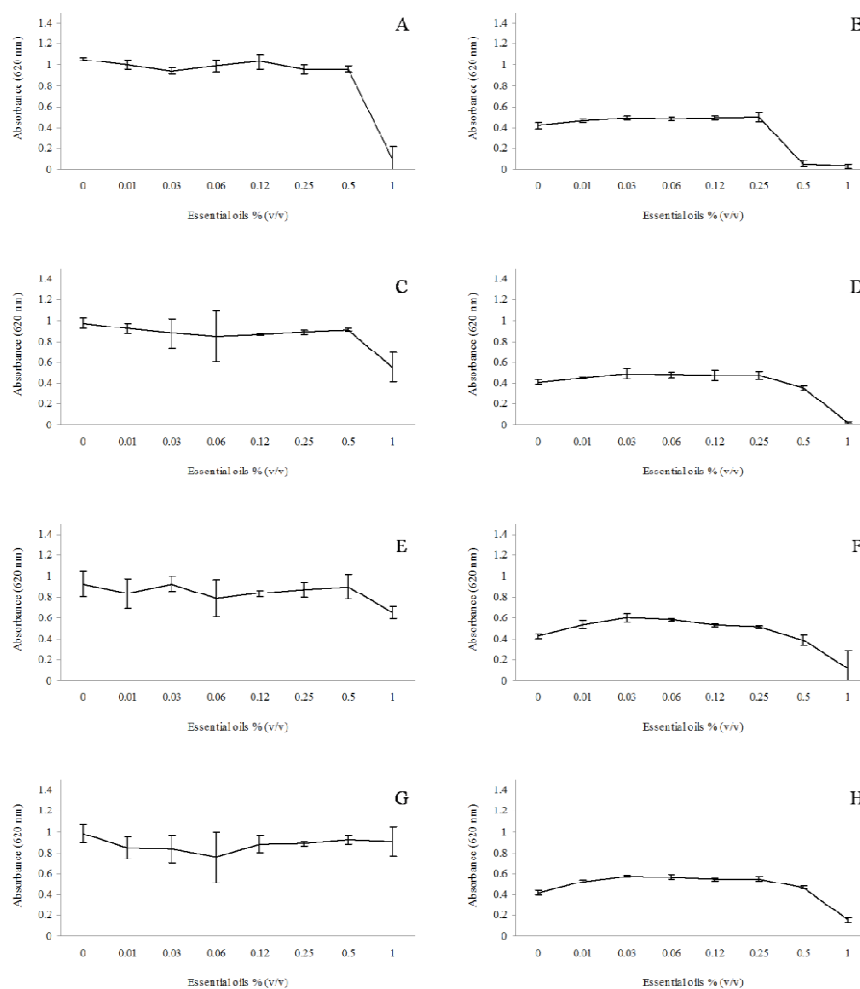


Fig. 2 - Antibacterial activity of different concentrations of the combinations of the essential oils (EOs) on the sessile cells. At each point, the results are equivalent to the average of three repetitions and the error bars represent the standard deviation. A) *Cinnamomum cassia* + *Cymbopogon flexuosus* and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). B) *C. cassia* + *C. flexuosus* and *Listeria monocytogenes*. C) *C. cassia* + *Melaleuca alternifolia* and EPEC. D) *C. cassia* + *M. alternifolia* and *L. monocytogenes*. E) *C. flexuosus* + *M. alternifolia* and EPEC. F) *C. flexuosus* + *M. alternifolia* and *L. monocytogenes*. G) *C. cassia* + *C. flexuosus* + *M. alternifolia* and EPEC. H) *C. cassia* + *C. flexuosus* + *M. alternifolia* and *L. monocytogenes*. The EOs were combined in equal proportions.

Several factors have been cited as responsible for the resistance of biofilms to antimicrobial agents. Bacteria on biofilms, particularly those present on the innermost layers, present reduced metabolic and growth rates, and are present at high population densities; the matrix of extracellular polymers acts as an adsorbent, reducing the amount of antimicrobial agent available to interact with the biofilm cells. In addition, the matrix of extracellular polymeric substances could physically reduce the penetration of the antimicrobial agent or cause its inactivation, and cells on the biofilm are physiologically distinct from planktonic cells and express specific protection factors (Vidal et al., 1997; Gilbert et al., 2002).

For the development of EO-based natural sanitizers for use in food industries, it is essential for them to be tested on the surfaces of the materials utilized in these places. Stainless steel is used in equipment and utensils utilized in food processing, such as tanks, pasteurizers and pipelines, and is easily hygienized and highly resistant to corrosion.

Early assays of stainless steel surfaces were focused on the formation of biofilms under static conditions and their susceptibility to antibacterial treatments. For *L. monocytogenes*, the solution containing 2.00% (v/v) *C. cassia* EO and the chemical sanitizer presented the greatest antibacterial effect ($p < 0.05$), totally eliminating the viable cells of the biofilm. However, 2.00% *C. cassia* EO (v/v) was a highly effective antimicrobial agent against EPEC ($p < 0.05$). Although alkyldimethylbenzylammonium chloride is frequently utilized in food industries, it might not be as effective against Gram-negative bacteria (Table 3).

Table 3 - Reductions in the numbers of viable enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* adhered to stainless steel obtained after exposition to solutions containing the essential oil (EO) of *Cinnamomum cassia* and an alkyl dimethylbenzylammonium chloride-based chemical sanitizer.

Treatments	EPEC		<i>L. monocytogenes</i>	
	Log CFU/cm ²	%	Log CFU/cm ²	%
EO (1% v/v)	0.83±0.05 ^a	12.67±0.71	2.33±1.51 ^a	33.23±21.55
Sanitizer	2.72±0.45 ^b	41.33±6.86	7.02±0.00 ^b	100.00±0.00
EO (2% v/v)	6.57±0.00 ^c	100.00±0.00	7.02±0.00 ^b	100.00±0.00

The results represent the average of three repetitions in Log CFU/cm² ± the standard deviation. The values were obtained by subtracting the number of cells present in the stainless steel coupons treated with the antibacterial solutions from the average number of cells of the coupons without any treatment. For each bacterial species, the equivalent letters do not differ from each other as determined by the Scott-Knott test at 5% probability.

When evaluating the influence of stirring upon the formation of bacterial biofilms, we discovered that *L. monocytogenes* was more capable of forming biofilms under static conditions than under stirring ($p < 0.05$). However, for EPEC, there was no difference among the conditions utilized from formation of the biofilms ($p > 0.05$) as determined by the analysis of variance (ANOVA) (Table 4).

Table 4 - Numbers (Log CFU/cm²) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* adhered to stainless steel obtained after incubation under static and stirring conditions.

Bacteria	Static condition	Under stirring (50 rpm)
EPEC	5.71±0.92	5.31±0.19
<i>L. monocytogenes</i>	6.56 ±0.07 ^a	5.83±0.28 ^b

The results are expressed as the average of three repetitions in Log CFU/cm² ± the standard deviation. For *L. monocytogenes*, the equivalent letters do not differ from each other as determined by the Scott-Knott test 5% probability.

The biofilms formed under stirring and static conditions presented different behaviors in terms of susceptibility to *C. cassia* EO. For EPEC, the number of viable sessile cells was lower ($p < 0.05$) after the treatment of the

biofilm formed under stirring. Nevertheless, it is important to note that for both of the biofilms, under static and under stirring conditions, a reduction of 100.00% of the adhered viable cells was obtained after treatment with a solution of *C. cassia* EO (Table 5). Interestingly, despite lower number of cells in the biofilm formed under stirring conditions (Table 4), *L. monocytogenes* was more resistant to the EO of *C. cassia* ($p < 0.05$); only 2.33 Log CFU/cm² cells were inactivated after the treatment with the antibacterial solution (Table 5). Recent studies demonstrated that the biofilms of *L. monocytogenes* formed under constant flow conditions present distinct gene expression when compared with that of biofilms formed under static conditions. Consequent changes in the architecture were also observed. These observations could result from an increase of the resistance to antibacterial treatments, which could vary according to the agent used (van der Veen and Abee, 2010a, 2010b).

Table 5 - Reductions in the numbers of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* adhered to stainless steel during incubation under static and stirring conditions obtained after exposition to a solution containing the essential oil (EO) of *Cinnamomum cassia*.

Treatment	EPEC			
	Static conditions		Under stirring (50 rpm)	
	Log CFU/cm ²	%	Log CFU/cm ²	%
EO (2% v/v)	5.71±0.00 ^a	100.00±0.00	5.31±0.00 ^b	100.00±0.00
Treatment	<i>L. monocytogenes</i>			
	Static conditions		Under stirring (50 rpm)	
	Log CFU/cm ²	%	Log CFU/cm ²	%
EO (2% v/v)	6.56±0.00 ^a	100.00±0.00	2.33±0.63 ^b	40.00±10.86

Results are expressed as the mean of three repetitions in Log CFU/cm² ± standard deviation. The values were obtained by subtracting the number of cells present on the stainless steel coupons with the antibacterial solutions from the average number of cells of the coupons without any treatment. For each bacterial species, the equivalent letters do not differ from each other as determined by the Scott-Knott test 5% probability.

Although all of the EOs and combinations presented a certain degree of antibacterial activity, at least against planktonic cells, the effect of the EO of *C. cassia* is significant when utilized singly. This EO showed promise for the production of a sanitizing solution for the control of bacterial biofilms in food industries, and further studies should be conducted to optimize the variables that could interfere in the efficiency of these solutions, such as concentration, time of contact and temperature. At present, studies that verify the anti-biofilm action of EOs in the food industry are scarce.

Before results are obtained specifically for *L. monocytogenes*, another area of interest concerns the influence of the formation of biofilms in different conditions, such static and constant flow, on their resistance to natural compounds through the evaluation of the expression of resistance genes involved in the response to bacterial stress. Many industrial food-processing conditions occur under constant flow, which demonstrates that the formation of biofilms under these processing conditions are a potential problem that must be researched and understood to develop adequate control alternatives.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for scholarships to the first and second authors and the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support.

References

- Acheson, D.W., 1999. Foodborne infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 15, 538–545.
- Altalhi, A.D., Hassan, S.A., 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control* 20, 913–917.
- Amalaradjou, M.A.R., Venkitanarayanan, K., 2011. Effect of *trans*-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J. Food Prot.* 74, 200–208.
- Araújo, V.S., Pagliares, V.A., Queiroz, M.L.P., Freitas-Almeida, A.C., 2002. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1172 – 1177.
- Ayala-Zavala, J.F., González-Aguilar, G. A., Del-Toro-Sánchez, L., 2009. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. *J. Food Sci.* 74, R84-R91.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Bezić, N., Skocibusic, M., Dinkic, V., Radonic, A., 2003. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytother. Res.* 17, 1037–1040.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Chen, H.D., Frankel, G., 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83–98.

Cordano, A.M., Jacquet, C., 2009. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 176–179.

Di Pasqua, R., Mamone, G., Ferranti, P., Ercolini, D., Mauriello, G., 2010. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*. 10, 1040–1049.

Doganay, M., 2003. Listeriosis: clinical presentation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 173-175.

Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shi, X.G., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T., 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother. Res.* 21, 989-994.

Gilbert, P., Allison, D.G., McBain, A.J., 2002. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* 92 Suppl., 98S-110S.

Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan, H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chem.* 103, 1449–1456.

Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C., Kumari, A., 2008. Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2, 258-261.

Ibram, S., Munteanu, A., Stolica, B., Enescu, M., Savulescu, C., Costinea, R., Popa, M.I., 2007. An outbreak of gastroenteritis in a campsite in Romania, July 2007. *Euro Surveill.* 12, E070816.1.

Jackson, K.A., Biggerstaff, M., Tobin-D'Angelo, M., Sweat, D., Klos, R., Nosari, J., Garrison, O., Boothe, E., Saathoff-Huber, L., Hainstock, L., Fagan, R.P., 2011. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated

with mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, hispanic women. J. Food Prot. 74, 949-953.

Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D., Stark, K., 2010. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006–2007. Foodborne Pathog. Dis. 7, 1581-1584.

Lado, B.H., Yousef, A.E., 2006. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, in: Ryser, E., Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*, listeriosis and food safety. CRC Press, Boca Raton, pp. 157-213.

Lomonaco, S., Decastelli, L., Nucera, D., Gallina, S., Bianchi, D. M., Civera, T., 2009. *Listeria monocytogenes* in gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. Int. J. Food Microbiol. 128, 516–520.

Mann, C.M., Cox, S.D., Markham, J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Lett. Appl. Microbiol. 30, 294-297.

Merritt, J.H., Kadouri, D.E., O'Toole, G.A., 2005. Growing and analyzing static biofilms. Curr. Protoc. Microbiol. Unit 1B.1, Basic protocol 1.

Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H., 2010. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int. J. Food Microbiol. 139, S3–S15.

Oliveira, M.M.M., Alves, E., Piccoli, R.H., 2010b. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. Braz. J. Microbiol. 41, 97-106.

Oliveira, M.M.M., Brugnera, D.F., Cardoso, M.G., Alves, E.; Piccoli, R.H., 2010a. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different

phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. Food Control 21, 549-553.

Oliveira, M.M.M., Brugnera, D.F., Cardoso, M.G., Guimarães, L.G.L., Piccoli, R.H., 2011. Yield, chemical composition and antilisterial activity of essential oils from *Cymbopogon* species. Rev. Bras. Pl. Med. 13, 8-16.

Ooi, L.S.M., Li, Y., Kam, S.L., Wang, H., Wong, E.Y.L., Ooi, V.E.C., 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. Am. J. Chin. Med. 34, 511–522.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2007. 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 18, 414–420.

Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo Nostro, A., 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. Food Control 21, 708-713.

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complement. Altern. Med. 6.

Rodrigues, L.B., Santos, L.R., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., Oliveira, A.P., Goetz, F., Nascimento, V.P., 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Braz. J. Microbiol. 41, 1082-1085.

Rossoni, E.M.M., Gaylarde, C.C., 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. Int. J. Food Microbiol. 61, 81-85.

Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM., 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 7-15.

Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Tech.* 20, 407-413.

Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Tech.* 43, 573-583.

Stepanović, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 40, 175–179.

Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G.V., Zeytinoglu, H.S., Vural, N., 2010. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food Chem. Toxicol.* 48, 3274–3280.

van der Veen, S., Abee, T., 2010a. Dependence of continuous-flow biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e on SOS response factor YneA. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1992–1995.

van der Veen, S., Abee, T., 2010b. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7854–7860.

Vidal, D.R., Ragot, C., Thibault, F., 1997. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. *Ann. Pharm. Fr.* 55, 49–54.

Watson, R., 2009. Deaths from listeriosis remain a cause for concern in Europe. *BMJ* 338, 258.

ARTIGO 2

Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces

Versão preliminar submetida ao periódico *Biofouling*, sendo preparada de acordo com suas normas de publicação.

Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces

Maíra Maciel Mattos de Oliveira*, Danilo Florisvaldo Brugnera, Josianne Arantes do Nascimento, Nádia Nara Batista and Roberta Hilsdorf Piccoli

Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brazil

Running head: Bacterial biofilm control by an essential oil and its main constituent

*Corresponding author. Email: mmacielmattos@yahoo.com.br

The antibacterial effects of *Cinnamomum cassia* essential oil (EO) and cinnamaldehyde were evaluated against single- and mixed-species cultivation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel. A Central Composite Rotational Design (CCRD) with two variables and eleven assays was used to optimize the concentrations (0.00-1.00% v/v for the EO and 0.00-0.80% v/v for cinnamaldehyde) and contact times (1-21 min). The models generated were validated and the effectiveness of *C. cassia* EO and cinnamaldehyde was compared with that of commercially available chemical sanitizers. Cinnamaldehyde and *C. cassia* EO proved to be efficient alternatives to commercial chemical sanitizers in the reduction or elimination of sessile bacterial cells. The activity of these natural compounds was, in most cases, superior or equivalent to that of the chemical sanitizers tested. However, *L. monocytogenes* was more resistant than EPEC to *C. cassia* EO and cinnamaldehyde, and the bacterial association in mixed-species biofilms made them more susceptible to these compounds.

Keywords: foodborne pathogens; enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC); *Listeria monocytogenes*; bacterial adhesion; natural sanitizers

Introduction

Essential oils (EOs) are volatile, natural, complex compounds characterized by a strong odor and are formed by aromatic plants as secondary metabolites. They consist of terpenes, terpenoids and aromatic compounds derived from phenylpropane. Generally, two or three major components are present at fairly high concentrations compared to others, which are present in trace amounts. In most cases, these major components determine the biological properties of the EOs (Bakkali et al., 2008).

These secondary metabolites have been largely employed for their properties observed in nature, i.e., antibacterial, antifungal and insecticidal activities. As typical lipophiles, they pass through the bacterial cell wall and cytoplasmic membrane, disrupt the structure of the different layers of polysaccharides, fatty acids and phospholipids and permeabilize them (Bakkali et al., 2008). The use of EOs to control bacterial pathogens has been shown *in vitro* (Chorianopoulos et al., 2004; Rota et al., 2004). The EO of *Cinnamomum cassia*, which is obtained from a plant species commonly known as China cinnamon, is one of the most effective EOs (Oussalah et al., 2007). An interesting feature of the EO from the bark of this species is the elevated content of cinnamaldehyde (Ooi et al., 2006), which is a phenylpropanoid with a high biological potential (Gill and Holley, 2006; Ooi et al., 2006).

In recent years, a search for antibacterial agents that can control foodborne pathogenic bacteria has been performed using sessile cells (Ronner and Wong, 1993; El-Ziney and Jakobsen, 2009). Sessile cells are used for three main reasons: (i) adherence to surfaces with consequent biofilms formation is the prevalent mode of microbial life (Watnick and Kolter, 2000; Nikolaev and Plakunov, 2007), (ii) sessile bacteria present on the surface of equipment and utensils can detach and contaminate food during processing (Flint et al., 2001; Midelet and Carpentier, 2002) and (iii) when present in these complex and

heterogeneous communities, microorganisms become more resistant to antimicrobials than when they are in the planktonic form (Norwood and Gilmour, 2000; Ryu and Beuchat, 2005).

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacterium found in foods of animal origin, such as milk and cheese (Lomonaco et al., 2009; Vanegas et al., 2009), and is commonly involved in outbreaks of food-borne infections that are characterized by a high mortality rate (Dorozynski, 2000). Strains of this species are psychrotrophic, resistant to some adverse conditions found in food processing (Jay et al., 2005; Lado and Yousef, 2006) and able to persist for years in food processing environments through biofilm formation (Unnerstad et al., 1996). Another pathogenic species of great importance is enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which is a major causative agent of childhood diarrhea (Chen and Frankel, 2005) and has been linked to outbreaks of food-borne infections (Ibrahim et al., 2007). EPEC has been reported in raw milk (Altalhi and Hassan, 2009) and in the environment of a dairy powder factory (Duffy et al., 2009).

Given the public health problem that these bacterial species represent, studies have been performed to identify new compounds with antibacterial activity for use in the food industry. Promising and natural alternatives are EOs and their constituents, whose antibacterial effects against bacterial cells in biofilms have been successfully demonstrated in recent studies (Oliveira et al., 2010a; Amalaradjou and Venkitanarayanan, 2011). In the current study, the antibacterial activity of the *C. cassia* EO and cinnamaldehyde were evaluated against EPEC and *L. monocytogenes* biofilms on a stainless steel surface after single- and mixed-species cultivation.

Material and methods

Bacterial species, standardization, storage and inoculum preparation

Listeria monocytogenes ATCC 19117 (serotype 4d) was purchased from the Culture Collection Section of the Medical Biology Division of the Adolfo Lutz Institute (São Paulo, São Paulo, Brazil). EPEC CDC O126 was provided by the Reference Materials Laboratory of the National Institute of Quality Control in Health of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil).

For standardization, the strains were inoculated in 150 mL of Tryptone Soya Broth (TSB), which was incubated at 37 °C. The growth curves were determined by performing periodic absorbance readings (600 nm) and serial dilutions in 0.1% peptone water (m/v). Using peptone water as a diluent and Tryptone Soya Agar (TSA) as the culture medium, spread plating methodology was implemented to determine the Log CFU/mL.

The strains were frozen at -18 °C in TSB containing 20% (v/v) glycerol. The cells were thawed for use by transferring an aliquot of frozen cells to a test tube containing TSB and incubating at 37 °C for 24 hours. Subsequently, the culture was transferred to 150 mL of TSB and incubated at 37 °C until the culture reached the required cell density. *L. monocytogenes* absorbance of 0.895 corresponded to 9.17 Log CFU/mL, and an EPEC absorbance of 1.217 corresponded to 9.09 Log CFU/mL. The dilutions were performed using an appropriate substrate to obtain the desired concentrations.

Bacterial biofilm formation

Stainless steel coupons, AISI 304 (#4) (1 x 8 x 18 mm), were sterilized according to the protocol of Rossoni and Gaylarde (2000), as cited by Oliveira et al. (2010a, 2010b). The coupons were arranged in Petri dishes (150 mm in diameter), and 60 mL of TSB containing the bacterial inoculum (8 Log CFU/mL) was added. The single-species biofilm bacterial inoculums were

composed exclusively of EPEC or *L. monocytogenes*. However, the mixed species biofilm bacterial inoculum was composed of both bacteria, each at a concentration of 8 log CFU/mL. The incubation was conducted at 37 °C for 48 hours while stirring at 50 rpm. Subsequently, the coupons were removed and washed three times with 0.85% (m/v) saline solution to remove non-adherent cells. To simulate the presence of high organic matter content on the surface, stainless steel coupons were quickly dipped in reconstituted whole milk (13 g/100 mL of sterile distilled water) and then placed inside a sterile empty Petri dish (150 mm diameter). After 1 hour at 37 °C, the coupons were subjected to antibacterial treatment. Each portion of 13 g of whole milk (Embaré Indústria Alimentícia S.A., Lagoa da Prata, Minas Gerais, Brazil) contained 5 g of carbohydrate, 3.4 g of protein, 3.45 g of total fat, 96 mg of sodium and 237 mg of calcium.

Experiment conduction

The experiment was conducted in two stages. In the first stage, Central Composite Rotational Design (CCRD) was used to optimize the concentrations and contact times of the antibacterial solutions and to determine maximum antibacterial activity against cells in biofilms. At this stage, the antibacterial solutions were composed of *C. cassia* EO or cinnamaldehyde. The second stage was performed with the values that were validated by CCRD, and the effectiveness of the natural sanitizing solutions was compared with that of commercially available chemical sanitizers.

First stage: CCRD

A CCRD with two variables was used. Five levels of contact time (1-21 min) and a concentration of *C. cassia* EO (0.00-1.00% v/v) or cinnamaldehyde (0.00-0.80% v/v) were selected. Eleven assays were conducted as follows: four with

the full factorial design 2^n ($n=2$), four axial points and three repetitions of the central point. The variation range for the two independent variables is presented in Table 1.

Table 1. Variables and experimental design.

Variables	-1.41	-1	0	1	1.41
Contact time (x1)	1	4	11	18	21
<i>Cinnamomum cassia</i> essential oil (% v/v) (x2)	0	0.15	0.5	0.85	1
Cinnamaldehyde (% v/v) (x3)	0	0.11	0.4	0.68	0.8

For each antibacterial agent (EO and cinnamaldehyde), bacterial strain (EPEC and *L. monocytogenes*) and condition of biofilm formation (single- and mixed-species cultivation) a statistical analysis was performed, which totaled eight CCRDs. The response variables were the values in Log CFU/cm² of EPEC or *L. monocytogenes*. The results of the analyses were evaluated with Response Surface Methodology (RSM) using Statistica 8.0 software. Variance analysis was used to test the fit of the models. The significance of the regression was evaluated by the F-test and determination coefficient.

Antibacterial solutions were prepared by homogenization of the EO or its constituent in sterile distilled water containing 0.5% (v/v) Tween 80. The solutions were prepared in test tubes and agitated via vortexing for 2 min. The EO of *C. cassia* bark was purchased from Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil) and, according to the company, contained 81% cinnamaldehyde. Cinnamaldehyde (>93%) was purchased from Sigma Aldrich. The amount of cinnamaldehyde in the antibacterial solutions was determined based on its concentration in *C. cassia* EO.

To apply treatments, stainless steel coupons were arranged inside Petri dishes and placed in contact with 20 mL of the antibacterial solution for the indicated contact time. Static conditions and a temperature of 40 °C were used.

Second stage: comparison of the antibacterial activity of C. cassia EO and cinnamaldehyde with that of commercial chemical sanitizers

The stainless steel coupons were exposed to solutions containing *C. cassia* EO or cinnamaldehyde. These solutions were prepared in accordance with the concentrations and contact times that showed the best antibacterial activity during the first stage, as detailed in Table 2. The solutions were diluted in sterile distilled water with 0.5% (v/v) Tween 80, and the application was performed under static conditions at 40 °C.

The following commercial chemical sanitizers were used: sodium hypochlorite (0.01% v/v, pH 7.00, Vetec), hydrogen peroxide (3% v/v, pH 4.00, Vetec) and Diprol bactericidal A-764, which consists of alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride (0.5% v/v, pH 10.00, Diprol), a quaternary ammonium compound. The commercial chemical sanitizers were diluted in sterile distilled water, and 20 mL of the solutions were applied to stainless steel coupons at room temperature under static conditions for 20 min.

A statistical analysis was performed to determine if there were differences between the bacterial biofilms of the two species and if the biofilms formation was influenced by single- and mixed-species cultivation. A 2 x 2 (bacterial species x single- or mixed-species cultivation) factorial scheme in a Completely Randomized Design (CRD) was performed. For the statistical analysis of the solutions antibacterial effects, each bacterial species (*EPEC* and *L. monocytogenes*) and biofilm condition (single- and mixed-species cultivation) was analyzed individually and CRD was also used. The experiment was repeated three times, and significant differences were determined ($p < 0.05$) using the

variance analysis (ANOVA). The means were compared by the Tukey test at a 5% probability. The response variable was expressed in Log CFU/cm². Sisvar software version 4.6 was utilized for all statistical analysis of this stage.

Microbiological analysis

The coupons were washed three times in a saline solution to remove residual *C. cassia* EO, cinnamaldehyde or the chemical sanitizer. The sessile cells were collected using swabs, transferred to 10 mL of peptone water and stirred on a vortex mixer for 2 min. At the second stage, untreated sessile cells were removed from the coupons and used as the control for the biofilm count. Serial dilutions of up to 10⁻⁴ were performed in 9 mL of peptone water. Plating was performed in triplicate using the microdrop technique (10 µL). EPEC was cultured in Eosin Methylene Blue Agar (EMB) and *L. monocytogenes* in Oxford Agar. The incubations were performed at 37 °C for 14 and 24 hours for EPEC and *L. monocytogenes*, respectively.

Table 2. Solutions of *Cinnamomum cassia* essential oil (EO) or cinnamaldehyde (CN) used in the second part of these experiment against enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* biofilms formed on

Solutions	Biofilms	EO (% v/v)	CN (% v/v)	pH	CT ³ (min)
A	Single-species	1.00	NU ²	3.64	20
B	Single-species	NU ²	0.80	4.25	20
C	Single-species	0.73	NU ²	3.88	16
D	Single-species	NU ²	0.60	4.37	16
E	Mixed-species	0.85	NU ²	3.59	18
F	Mixed-species	NU ²	0.68	4.05	18

¹*Listeria monocytogenes*. ²Not used. ³Contact time.

Results

First stage

The results of the initial stage of this study are from the evaluation of the antibacterial activity of *C. cassia* EO and cinnamaldehyde against single- and mixed-species biofilms formed by EPEC and *L. monocytogenes* and are shown in Tables 3 and 4. These results were obtained using CCRD.

Table 3. Central Composite Rotational Design (CCRD) matrix with real and coded levels of independent responses (Log CFU/cm²) and variables obtained after biofilms were subjected to different concentrations of *Cinnamomum cassia* essential oil (EO).

Assays	x1 CT ¹ (min)	x2 EO ² (% v/v)	Y1 ³	Y2 ⁴	Y3 ⁵	Y4 ⁶
1	-1 (4)	-1 (0.15)	5.76	4.69	6.14	4.84
2	1 (18)	-1 (0.15)	4.02	3.87	5.71	5.44
3	-1 (4)	1 (0.85)	3.87	0.00 ⁷	5.06	3.59
4	1 (18)	1 (0.85)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	3.88	0.00 ⁷
5	-1.41 (1)	0 (0.5)	4.32	4.06	6.22	5.84
6	1.41 (21)	0 (0.5)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	5.76	0.00 ⁷
7	0 (11)	-1.41 (0)	5.08	5.34	6.14	5.20
8	0 (11)	1.41 (1)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	3.80	0.00 ⁷
9	0 (11)	0 (0.5)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	6.28	4.32
10	0 (11)	0 (0.5)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	5.78	3.78
11	0 (11)	0 (0.5)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	5.91	4.40

¹Contact time. ²Essential oil. ³Counts of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) cells present in a single-species biofilm. ⁴Counts of EPEC cells present in a mixed-species biofilm formed with *Listeria monocytogenes*. ⁵Counts of *L. monocytogenes* cells present in a single-species biofilm. ⁶Counts of *L. monocytogenes* cells present in a mixed-species biofilm formed with EPEC. ⁷Value assigned to the tests where no viable cells were detected by the plate count method.

Table 4. Central Composite Rotational Design (CCRD) matrix with real and coded levels of independent and response (Log CFU/cm²) variables obtained after biofilms were subjected to different concentrations of cinnamaldehyde (CN).

Assays	x1 CT ¹ (min)	x3 CN ² (% v/v)	Y5 ³	Y6 ⁴	Y7 ⁵	Y8 ⁶
1	-1 (4)	-1 (0.11)	5.73	4.86	4.48	5.15
2	1 (18)	-1 (0.11)	5.20	4.81	6.03	4.69
3	-1 (4)	1 (0.68)	3.76	0.00 ⁷	4.32	4.97
4	1 (18)	1 (0.68)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	5.20	0.00 ⁷
5	-1.41 (1)	0 (0.4)	4.71	3.97	6.07	4.94
6	1.41 (21)	0 (0.4)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	4.21	0.00 ⁷
7	0 (11)	-1.41 (0)	5.97	4.78	5.59	4.64
8	0 (11)	1.41 (0.8)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	4.08	0.00 ⁷
9	0 (11)	0 (0.4)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	5.86	4.48
10	0 (11)	0 (0.4)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	6.15	4.96
11	0 (11)	0 (0.4)	0.00 ⁷	0.00 ⁷	5.48	3.57

¹Contact time. ²Essential oil. ³Counts of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) cells present in a single-species biofilm. ⁴Counts of EPEC cells present in a mixed-species biofilm formed with *Listeria monocytogenes*. ⁵Counts of *L. monocytogenes* cells present in a single-species biofilm. ⁶Counts of *L. monocytogenes* cells present in a mixed-species biofilm formed with EPEC. ⁷Value assigned to the tests where no viable cells were detected by the plate count method.

All three variables (x1, contact time; x2, *C. cassia* EO concentration and x3, cinnamaldehyde concentration) had a significant effect on the viability of the adherent bacterial cells in the following conditions: (Y1) counts (Log CFU/cm²) of EPEC cells present in a single-species biofilm after treatment with *C. cassia* EO, (Y2) counts of EPEC cells present in a mixed-species biofilm formed with *L. monocytogenes* after treatment with *C. cassia* EO, (Y3) counts of *L. monocytogenes* cells present in a single-species biofilm after treatment with *C. cassia* EO, (Y4) counts of *L. monocytogenes* cells present in a mixed-species biofilm formed with EPEC after treatment with *C. cassia* EO, (Y5) counts of EPEC cells present in a single-species biofilm after treatment with

cinnamaldehyde, (Y6) counts of EPEC cells present in a mixed-species biofilm formed with *L. monocytogenes* after treatment with cinnamaldehyde, and (Y8) the counts of *L. monocytogenes* cells present in a mixed-species biofilm formed with EPEC after treatment with cinnamaldehyde. The contact time (x1) and concentration of cinnamaldehyde (x3) had no significant effect on the antibacterial activity of cinnamaldehyde against *L. monocytogenes* single-species biofilms (Y7).

In most trials, the independent variables (x1, x2 and x3) had a negative linear effect and a positive quadratic effect. A significant negative effect between the independent variables x1 and x2 for the response variable Y4 and the variables x1 and x3 for the response variables Y5 and Y8 were verified.

Regression models of the second order were generated and contained linear terms, quadratic terms and the binary interactions of two independent variables (x1 and x2 or x1 and x3). The models were subjected to variance analysis. For all models, the calculated F value was higher than the tabulated F (5%) value and the determination coefficients were greater than 89% (Tables 5 and 6). The models were a good fit to the data, and contour curves (Figure 1 and 2) were generated. Regression coefficients of the models generated in coded variables are listed in Tables 7 and 8.

Table 5. Variance analysis of regression models relating the response variables Y1 to Y4.

Responses	SV ¹	SS ²	DF ³	MS ⁴	Fcal ⁵	Ftab*	R ₂ ⁶
Y1	Regression	58.06	5	11.61	23.91	3.45	95.98
	Residue	2.43	5	0.48			
	Total	60.49	10				
Y2	Regression	49.35	5	9.87	15.09	3.45	93.78
	Residue	3.27	5	0.65			
	Total	52.63	10				
Y3	Regression	7.57	5	1.51	17.56	3.45	94.61
	Residue	0.43	5	0.09			
	Total	8.01	10				
Y4	Regression	47.36	5	9.47	9.85	3.45	90.78
	Residue	4.81	5	0.96			
	Total	52.16	10				

¹Source of variation. ²Sum of squares. ³Degrees of freedom. ⁴Mean squares.

⁵Calculated values of F. *Tabulated values of F at 5%. ⁶Coefficient of determination.

Table 6. Variance analysis of regression models relating the response variables Y5, Y6 and Y8.

Responses	SV ¹	SS ²	DF ³	MS ⁴	Fcal ⁵	Ftab*	R ₂ ⁶
Y5	Regression	70.42	5	14.08	24.58	3.45	96.09
	Residue	2.86	5	0.57			
	Total	73.28	10				
Y6	Regression	49.47	5	9.89	9.86	3.45	90.79
	Residue	5.02	5	1.00			
	Total	54.48	10				
Y8	Regression	44.28	5	8.86	8.66	3.45	89.64
	Residue	5.11	5	1.02			
	Total	49.39	10				

¹Source of variation. ²Sum of squares. ³Degrees of freedom. ⁴Mean squares.

⁵Calculated values of F. *Tabulated values of F at 5%. ⁶Coefficient of determination.

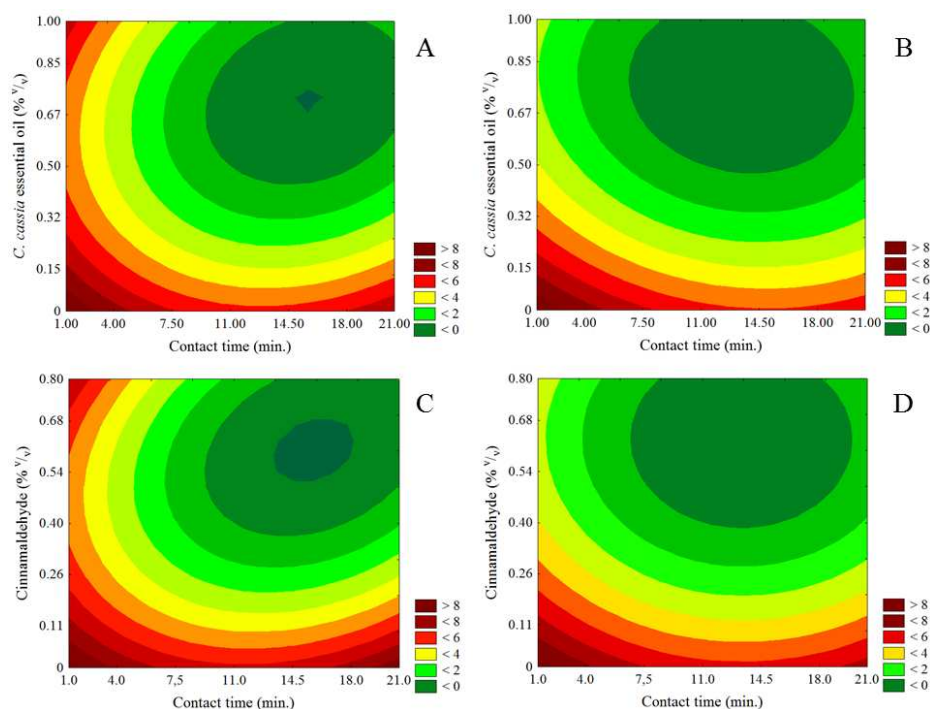


Figure 1. Contour curves obtained as a function of the count (Log CFU/cm²) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) sessile cells present on the stainless steel surface after treatment with antibacterial solutions. (A) Treatment of a single-species biofilm with *Cinnamomum cassia* EO. (B) Treatment of a mixed-species biofilm consisting of *Listeria monocytogenes* co-culture with *C. cassia* EO. (C) Treatment of a single-species biofilm with cinnamaldehyde. (D) Treatment of a mixed-species biofilm containing *Listeria monocytogenes* with cinnamaldehyde.

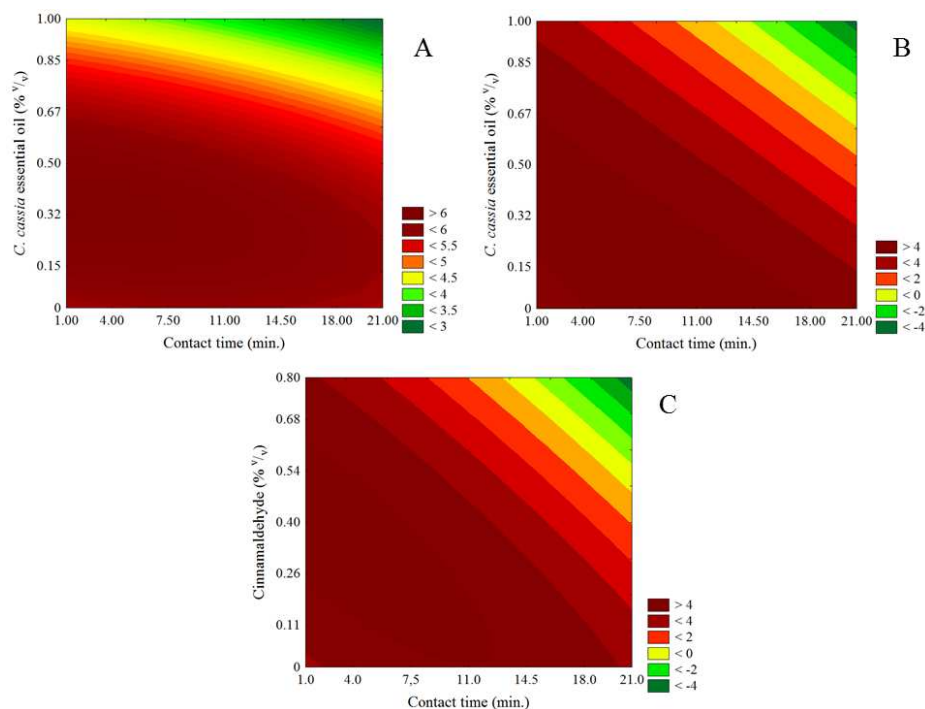


Figure 2. Contour curves obtained as a function of the count (Log CFU/cm²) of *Listeria monocytogenes* sessile cells present on a stainless steel surface after treatment with antibacterial solutions. (A) Treatment of a single-species biofilm with *Cinnamomum cassia* EO. (B) Treatment of a mixed-species biofilm consisting of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) co-culture with *C. cassia* EO. (C) Treatment of a mixed-species biofilm containing EPEC with cinnamaldehyde.

Table 7. Regression coefficients for the response variables Y1 to Y4.

Variables	Y1	Y2	Y3	Y4
Mean	-0.00416	0.00089	5.991662*	4.16548*
x1	-1.467358*	-0.82076*	-0.281847*	-1.40789*
x1 ²	1.35195*	0.96486*	-0.071428	-0.44528
x2	-1.63913*	-2.01631*	-0.777909*	-1.75750*
x2 ²	1.54353*	1.28530*	-0.584401*	-0.60739
x1.x2	-0.53123	0.20427	-0.188007	-1.04926*

*Significant (p<0.05).

Table 8. Regression coefficients for the response variables Y5, Y6 and Y8.

Variables	Y5	Y6	Y8
Mean	-0.00392	-0.00086	4.32901*
x1	-1.36934*	-0.70674	-1.55477*
x1 ²	1.43439*	1.05266*	-0.60316
x3	-1.95331*	-2.05695*	-1.43139*
x3 ²	1.75118*	1.25710*	-0.67887
x1.x3	-0.80989*	0.01105	-1.12587*

*Significant (p<0.05).

The values of the response variables (Y1 to Y6 and Y8) decreased as the contact time (x1) and concentration of *C. cassia* EO (x2) or cinnamaldehyde (x3) increased (Figures 1 and 2). However, the EOs of *C. cassia* and cinnamaldehyde were more effective against EPEC than *L. monocytogenes*. Lower concentrations of these compounds and lower contact times were required to obtain lower values of response variables related to the gram-negative species used (Y1, Y2, Y5, Y6).

For EPEC, we observed regions that had intervals of contact time (x1) and concentrations of *C. cassia* EO (x2) or cinnamaldehyde (x3) where the response variables (Y1, Y2, Y5 and Y6) were optimized, i.e., where the treatments completely eliminated all viable sessile cells. These following intervals were observed: between 14.5 and 15.5 min of contact time and 0.67 and 0.77% (v/v) of *C. cassia* EO for single-species biofilms (Figure 1A), between 7 and 20 min of contact time and above 0.5% (v/v) of *C. cassia* EO for mixed-species biofilms formed with *L. monocytogenes* (Figure 1B), between 13.5 and 18 min of contact time and 0.54% and 0.68% (v/v) of cinnamaldehyde for single-species biofilms (Figure 1C), and between 7.5 and 20 min of contact time and above 0.4% (v/v) of cinnamaldehyde for mixed-species biofilms formed with *L. monocytogenes* (Figure 1D). For *L. monocytogenes*, this optimization was not possible for the variables Y3, Y4 and Y8. However, in the *L. monocytogenes* biofilms formed in mixed-species cultivation with EPEC (Y4

and Y8), it was possible to find values that reduced the dependent variables that were studied to satisfactory levels for both *C. cassia* EO and cinnamaldehyde. The values for *C. cassia* EO were a contact time greater than 13 min and concentrations higher than 0.65% (v/v) (Figure 2B), and the values for cinnamaldehyde were a contact time greater than 13.5 min and concentrations higher than 0.5% (v/v) (Figure 2C).

The effects of cinnamaldehyde and the *C. cassia* EO on the single- and mixed-species biofilms were similar for both bacterial species. However, the multi-species biofilms were more sensitive to treatment with antibacterial agents than the single species biofilms (Figures 1 and 2).

Second stage

The sessile cell counts of EPEC and *L. monocytogenes* from single- and mixed-species biofilms are presented in Table 9. No detectable differences ($p>0.05$) were found by ANOVA between the formation of biofilms in single- and mixed-species cultivation for either bacterial species. Similarly, no differences ($p>0.05$) were detected between the number of adherent EPEC and *L. monocytogenes* cells in biofilms.

Table 9. Counts (Log CFU/cm²) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* sessile cells obtained after single- and mixed-species cultivation.

Bacteria	Single-species biofilm	Mixed-species biofilm
EPEC	4.86±0.78	5.62±0.28
<i>L. monocytogenes</i>	5.64±0.13	5.25±0.14

The results are expressed as the average of three repetitions ± the standard deviation.

The values obtained using DCCR in the first stage were used to determine the best concentration and application of solutions containing *C. cassia* EO or cinnamaldehyde for the second stage (Table 2). The antibacterial

activity of both compounds were assessed against the cells in biofilms and compared with that of commercial chemical sanitizers. The cell counts from the biofilms (Table 9) were used to calculate the reduction of viable sessile cells after treatment with antibacterial agents. It was found that *C. cassia* EO, cinnamaldehyde and the chemical sanitizers hydrogen peroxide and quaternary ammonium efficiently eliminated all viable cells present in EPEC and *L. monocytogenes* biofilms. There was no significant difference between the antibacterial effects of these treatments ($p>0.05$). However, sodium hypochlorite treatment differed from the others, as it only caused a small reduction in the cell count ($p<0.05$) (Table 10).

Table 10. Reduction in sessile cell counts of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and *Listeria monocytogenes* obtained after exposure to solutions containing *Cinnamomum cassia* essential oils, cinnamaldehyde or chemical sanitizers.

Treatments	EPEC			
	Single-species biofilm		Mixed-species biofilm	
	Log CFU/cm ²	%	Log CFU/cm ²	%
SH ¹	0.47±0.50 ^a	9.76±10.20	1.14±0.75 ^a	20.26±13.31
EO ²	4.86±0.00 ^b	100.00±0.00	5.62±0.00 ^b	100.00±0.00
CN ³	4.86±0.00 ^b	100.00±0.00	5.62±0.00 ^b	100.00±0.00
HP ⁴	4.86±0.00 ^b	100.00±0.00	5.62±0.00 ^b	100.00±0.00
QA ⁵	4.86±0.00 ^b	100.00±0.00	5.62±0.00 ^b	100.00±0.00

Treatments	<i>L. monocytogenes</i>			
	Single-species biofilm		Mixed-species biofilm	
	Log UFC/cm ²	%	Log UFC/cm ²	%
SH ¹	0.90±0.07 ^a	15.90±1.22	0.38±1.15 ^a	7.16±3.00
EO ²	2.54±0.35 ^b	45.00±6.30	5.25±0.00 ^b	100.00±0.00
CN ³	2.79±0.50 ^b	49.40±8.36	5.25±0.00 ^b	100.00±0.00
HP ⁴	5.64±0.00 ^c	100.00±0.00	5.25±0.00 ^b	100.00±0.00
QA ⁵	5.64±0.00 ^c	100.00±0.00	5.25±0.00 ^b	100.00±0.00

¹Sodium hypochlorite. ²Essential oil. ³Cinnamaldehyde. ⁴Hydrogen peroxide.

⁵Quaternary ammonium. The results are expressed as the average of three repetitions ± the standard deviation. The values were obtained by subtracting the number of cells present on the stainless steel coupons treated with antibacterial solutions from the average number of cells present on the coupons without treatment. For each bacterial species, the means followed by equal letters within the same column do not differ from each other as determined by the Tukey test at 5% probability.

Discussion

C. cassia EO and its major constituent cinnamaldehyde are effective antimicrobials with broad-spectrum activity (Ooi et al., 2006). The antibacterial activity of *C. cassia* EO and cinnamaldehyde on planktonic cells of *E. coli* and *L. monocytogenes* has been verified in several studies (Chang et al., 2001; Gill and Holley et al., 2004; Ooi et al., 2006; Oussalah et al., 2007). *E. coli* O157: H7 and *L. monocytogenes* exposed to *C. cassia* EO had ruptured cell membranes, reduced intracellular ATP and had released their cellular constituents, which

suggests that the cytoplasmic membrane is directly involved in the mechanism of antibacterial action (Oussalah et al., 2006). However, it is important to emphasize that although the antimicrobial potential of *C. cassia* EO is well proven, there are no reports regarding the effect of it or its major constituents on *E. coli* and *L. monocytogenes* present in biofilms formed on the surface of materials, such as stainless steel, used in the food industry.

In both stages of this experiment, the antibacterial effect of cinnamaldehyde was similar to that presented by *C. cassia* EO. This finding indicates that the biological effects of *C. cassia* bark EO on microorganisms can be attributed to its major constituent (cinnamaldehyde), which is normally present in concentrations above 80%, corroborating the findings of Ooi et al. (2006). This result is interesting for the industrial application of the solutions developed in this study. It is known that different factors can affect the chemical composition of EOs, such as geographic location and time of harvesting. Thus, more accurate and reproducible standardization can be achieved using the constituents of the EOs to prepare natural sanitizers.

In studies that evaluate the antibacterial potential of different agents, it is common for authors to use both gram-negative and gram-positive bacterial strains, which usually have different susceptibility profiles. Normally, gram-negative bacteria, such as EPEC, are more resistant than gram-positive bacteria because their outer membrane serves as an additional barrier making the diffusion of the constituents of the EOs into the bacterial cell difficult (Mann et al., 2001; Burt, 2004). The nucleus and the O antigen in the lipopolysaccharide of the outer membrane of gram-negative bacteria are hydrophilic, which prevents the accumulation of EOs in the cytoplasmic membrane (Bezic et al., 2003). However, in the first stage of this study and in a part of the second stage (single-species biofilm), sessile cells of *L. monocytogenes* were more resistant to *C. cassia* EO and cinnamaldehyde than the cells of the gram-negative species

used (EPEC). Similarly, Perez-Conesa et al. (2006) evaluated the antimicrobial efficacy of encapsulated carvacrol and eugenol on strains of *L. monocytogenes* and *E. coli* O157: H7 in biofilms and found that the gram-negative bacteria were more sensitive to the antimicrobial agents compared to the gram-positive bacteria. According to the studies of Rieu et al. (2008a), van der Veen and Abee (2010a) and van der Veen and Abee (2010b), biofilms formed by *L. monocytogenes* under conditions of constant flow may have different architecture and greater expression of genes related to the cellular stress response, which can cause an increase in resistance to antibacterial agents. These facts may explain the results obtained in this work because our previous studies (data not shown) demonstrated that in EPEC and *L. monocytogenes* biofilms formed in static conditions on polystyrene microplate wells and stainless steel coupons, gram-negative species were more resistant to *C. cassia* EO.

Another factor that influences the antimicrobial susceptibility and the number of attached cells, is the formation of biofilms using a co-culture of two or more strains. The mixed-species biofilm formation did not influence the number of adherent EPEC and *L. monocytogenes* cells but did cause them to become more sensitive to *C. cassia* EO and cinnamaldehyde. This result differs from that observed by Simões et al. (2009) and van der Veen e Abee (2011), who noticed that biofilms formed during the co-culture of two bacterial species were more resistant to antibacterial treatments. However, according to Burmølle et al. (2006), most biofilms in their natural environment consist of a consortium of species that can influence each other both in a synergistic and antagonistic manner, and based on the results of Rieu et al. (2008b) and Deng et al. (2009), it can be inferred that the influence of mixed-species biofilm formation on the number of sessile cells may vary with the strains involved and may or may not occur.

In the second stage of the study, it was found that *C. cassia* EO and cinnamaldehyde had antibacterial effects on cells in biofilms, which did not differ from the effects of hydrogen peroxide and quaternary ammonium, two commercial chemical sanitizers widely used in food processing facilities. All of the tested agents completely eliminated the viable cells in EPEC and *L. monocytogenes* biofilms. This fact highlights a promising future application of natural-based sanitizers containing EOs or their constituents to control biofilms in the food industry. Although there are only a few reports regarding the effectiveness of EOs against biofilms formed on stainless steel surfaces, Chorianopoulos et al. (2008) emphasized that EOs may be more effective antibacterial agents than the chemical treatments commonly used in the food industry. The authors found that 1% (v/v) *Satureja thymbra* EO was more efficient than acid (hydrochloric acid and lactic acid) and basic (sodium hydroxide) sanitizers in the control of bacterial biofilms formed by different species, such as *L. monocytogenes*.

Among the factors that influence the effectiveness of chemical sanitizers used in the dairy industry is the presence of milk or dairy product residues. One of the desirable characteristics for these agents is to be active even in the presence of organic matter. However, it is known that the antimicrobial effects in the presence of these substances may be reduced depending on the active ingredient used. Thus, it is important to evaluate the effectiveness of sanitizers in the presence of milk residue because in the dairy industry, biofilms contain bacteria, extracellular polymeric substances and significant amounts of milk residue, particularly protein and minerals, such as calcium phosphate (Kumar and Anand, 1998, Bremer et al., 2006). Using scanning electron microscopy, it was observed that after 18 hours of contact with milk some of the bacteria in biofilms that formed on the surface of stainless steel coupons were associated with debris, proteins and carbohydrates (Bremer et al., 2006). Although studies

show that the effectiveness of chemical sanitizers, such as sodium hypochlorite, is affected by the presence of organic matter (Best et al. 1990; Kich et al., 2004, Souza and Daniel, 2005), little is known about the effect of milk on the anti-biofilm activity of EOs and their constituents. In this research, *C. cassia* EO and cinnamaldehyde showed high antibacterial activity, even in the presence of whole reconstituted milk residues on the surface of stainless steel.

Conclusions

C. cassia EO and cinnamaldehyde are promising options for the development of natural sanitizers to be used in the control of bacterial biofilms, especially in the dairy industry. In this context, to prove the real effectiveness of these alternatives, further studies should be conducted in industrial conditions, where the biofilms form complex and heterogeneous communities that have different microbial species.

Acknowledgements

The authors would like to thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for scholarships to the first and second authors and the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support.

References

- Altalhi AD, Hassan SA. 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control* 20:913–917.
- Amalaradjou MAR, Venkitanarayanan K. 2011. Effect of *trans*-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J Food Prot* 74:200-208.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol* 46:446-475.
- Best M, Kennedy ME, Coates F. 1990. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol* 56:377-380.
- Bezić N, Skocibusic M, Dinkic V, Radonic A. 2003. Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytother Res* 17:1037-1040.
- Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int J Food Microbiol* 106:254-262.
- Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl Environ Microbiol* 72:3916–3923.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol* 94:223-253.
- Chang ST, Chen PF, Chang SC. 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol* 77:123-127.
- Chen HD, Frankel G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29:83–98.

Chorianopoulos N, Kalpoutzakis E, Aligiannis N, Mitaku S, Nychas GJ, Haroutounian AS. 2004. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *J Agric Food Chem* 52:8261-8267.

Chorianopoulos NG, Giaouris ED, Skandamis PN, Haroutounian SA, Nychas GJE. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. *J Appl Microbiol* 104:1586-1596.

Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RAM, Jiang LM, van der Sluis LWM, Ten Cate JM, Crielaard W. 2009. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *J Endod* 35:1249-1252.

Dorozynski A. 2000. Seven die in French listeria outbreak. *BMJ* 320:601.

Duffy LL, O’Callaghan D, McAuley CM, Fegan N, Craven HM. 2009. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Australian dairy powder factory environments. *Int Dairy J* 19:178-179.

El-Ziney MG, Jakobsen M. 2009. Effectiveness of reuterin alone and in combination with nisin or other food contact surfaces sanitizers and cleaners for disinfection of stainless steel surfaces contaminated with *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. *Int J Food Agr Environ* 7:145-149.

Flint S, Palmer J, Bloemen K, Brooks J, Crawford R. 2001. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *J Appl Microbiol* 90:151-157.

Gill AO, Holley RA. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol* 70:5750–5755.

Gill AO, Holley RA. 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. Int J Food Microbiol 108:1-9.

Ibram S, Munteanu A, Stolica B, Enescu M, Savulescu C, Costinea R, Popa MI. 2007. An outbreak of gastroenteritis in a campsite in Romania, July 2007. Eurosurveillance 12: E070816.1.

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. 2005. Modern food microbiology. 7th ed. New York (NY): Springer.

Kich JD, Borowsky L, Silva VS, Ramenzoni M, Triques N, Kooler FL, Cardoso MRI. 2004. Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella typhimurium* strains isolated from swine. Acta Sci Vet 32:33-39.

Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry. Int J Food Microbiol 42:9-27.

Lado BH, Yousef AE. 2006. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: Ryser E, Marth EH. (Eds.). *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Boca Raton (FL): CRC Press. p. 157-213.

Lomonaco S, Decastelli L, Nucera D, Gallina S, Bianchi DM, Civera T. 2009. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time. Int J Food Microbiol 128:516-520.

Mann CM, Cox SD, Markham JL. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). Lett Appl Microbiol 30:294-297.

Midelet G, Carpentier B. 2004. Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. J Appl Microbiol 97:262-270.

Nikolaev YA, Plakunov VK. 2007. Biofilm: “City of Microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76:125-138.

Norwood DE, Gilmour A. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* 88:512-520.

Oliveira MMM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RH. 2010b. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Braz J Microbiol* 41:97-106.

Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. 2010a. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control* 21:549-553.

Ooi LSM, Li Y, Kam SL, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC. 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal Herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am J Chin Med* 34:511–522.

Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. 2007. 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* 18:414-20.

Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. 2006. Mechanism of action of spanish oregano, chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 69:1046-1055.

Pérez-Conesa D, McLandsborough L, Weiss J. 2006. Inhibition and inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 colony biofilms by micellar-encapsulated eugenol and carvacrol. *J Food Prot* 69:2947-2954.

Rieu A, Briandet R, Habimana O, Garmyn D, Guzzo J, Piveteau P. 2008a. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl Environ Microbiol* 74:4491-4497.

Rieu A, Lemaître JP, Guzzo J, Piveteau P. 2008b. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* 126:76–82.

Ronner AB, Wong ACL. 1993. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *J Food Prot* 56:750-758

Rossoni EMM, Gaylarde CC. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol* 61:81-85.

Rota C, Carramiñana JJ, Burillo J, Herrera A. 2004. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J Food Prot* 67:1252-1256.

Ryu JH, Beuchat LR. 2005. Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* 71:247-254.

Simões M, Simões LC, Vieira MJ. 2009. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Wat Res* 43:229-237.

Souza JB, Daniel LA. 2005. Comparison between sodium hipoclorite and peracetic acid for *E. coli*, coliphages and *C. perfringens* inactivation of high organic matter concentration water. *Eng Sanit Ambient* 10:111-117.

Unnerstad H, Bannerman E, Bille J, Danielsson-Tham ML, Waak E, Tham W. 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. *Netherland Milk Dairy J* 50:493–499.

van der Veen S, Abee T. 2010a. Dependence of continuous-flow biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e on SOS response factor YneA. Appl Environ Microbiol 76:1992-1995.

van der Veen S, Abee T. 2010b. Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. Appl Environ Microbiol 76:7854-7860.

van der Veen S, Abee T. 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. Int J Food Microbiol 144:421-431.

Vanegas MC, Vásquez E, Martinez AJ, Rueda AM. 2009. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. Food Control 20:430–432.

Watnick P, Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. J Bacteriol 182:2675-7679.

RESULTADOS OBTIDOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, a atividade antibacteriana de óleos essenciais, sozinhos e em combinação, foi avaliada contra células planctônicas e sésseis de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), bactérias patogênicas de grande importância para a Microbiologia de Alimentos. O intuito principal foi o de selecionar o óleo essencial ou combinação mais efetivos para a elaboração de um sanitizante natural a ser utilizado no controle de biofilmes bacterianos formados sobre superfície de aço inoxidável. Nos parágrafos abaixo, encontra-se um resumo dos resultados obtidos nos dois artigos originados desta tese, uma relação entre eles, bem como perspectivas para o desenvolvimento de estudos futuros.

Pela realização de *screening*, pela técnica de difusão em ágar e da determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMIs), verificou-se que os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon flexuosus* e *Cinnamomum cassia*, sozinhos e em combinação, apresentaram atividade antibacteriana, em diferentes intensidades, contra células planctônicas das espécies bacterianas utilizadas. A atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. cassia*, quando utilizado sozinho, mereceu destaque, apresentando halos de inibição de 13,72 mm, quando utilizado contra EPEC, e 22,42 mm, quando utilizado contra *L. monocytogenes*. Além de CMI de 0,06 % v/v para EPEC e 0,03% v/v para *L. monocytogenes*.

Comportamento semelhante foi observado contra células bacterianas aderidas em cavidades de microplacas de poliestireno. Contudo, apesar do óleo essencial de *C. cassia* ter novamente se destacado, observou-se que as células em biofilme mostraram-se mais resistentes aos óleos essenciais e combinações, somente as concentrações mais elevadas utilizadas (0,5 e 1% v/v) apresentaram efeito contra as células sésseis. Esse resultado demonstra o risco que a formação

de biofilmes bacterianos sobre as superfícies de equipamentos e utensílios representa para a qualidade microbiológica de alimentos, pois, células sésseis, além de serem capazes de se desprender e contaminar os alimentos que passam pelo local durante o processamento, são mais resistentes a antibacterianos empregados para o seu controle, sendo de mais difícil erradicação.

Enfatiza-se que o *screenig* apresentou-se como um pré-teste rápido e de fácil execução, podendo ser utilizado para a seleção dos óleos essenciais mais efetivos, por apresentar resultado compatível com as CMIs obtidas e com o ensaio em microplacas de poliestireno.

Observando-se a maior atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. cassia*, este foi selecionado para a elaboração de soluções que foram testadas contra biofilmes bacterianos formados sobre a superfície de cupons de aço inoxidável. Verificou-se que uma solução contendo 2% v/v de óleo essencial de *C. cassia* foi efetiva em eliminar as células bacterianas sésseis viáveis, 6,57 Log UFC/cm² para EPEC e 7,02 Log UFC/cm² para *L. monocytogenes*. O aço inoxidável é um dos materiais mais utilizados em equipamentos e utensílios de indústrias de alimentos, como bancadas, tanques e tubulações de uma maneira geral. Portanto, é importante que testes que avaliem a atividade de novos antibacterianos utilizem células bacterianas aderidas neste material, conforme foi realizado neste estudo.

Constatações importantes nos resultados já relatados desta tese foram as de que a espécie Gram-negativa utilizada (EPEC) mostrou-se mais resistente aos óleos essenciais e combinações do que a espécie Gram-positiva (*L. monocytogenes*), tanto em estado planctônico quanto em biofilme. No entanto, este fato se inverteu, quando o biofilme foi formado sob agitação de 50 rpm ao invés de em condições estáticas, *L. monocytogenes* tornou-se mais resistente. Isso demonstra que as condições de formação do biofilme, no caso a presença de um substrato em fluxo constante, influenciaram na susceptibilidade de *L.*

monocytogenes ao óleo essencial de *C. cassia*. Mais estudos devem ser conduzidos para elucidar este resultado, como a compreensão de mudanças na arquitetura e na expressão de genes de resistência após a formação de biofilme por *L. monocytogenes* em condições de fluxo constante do substrato.

Após verificar a atividade antibacteriana da solução de óleo essencial de *C. cassia* contra células bacterianas aderidas em cupons de aço inoxidável, julgou-se necessário estudar a influência das variáveis concentração de óleo essencial (0-1% v/v) e tempo de contato da solução (1-21 min.). Este foi o principal objetivo do segundo artigo desenvolvido. Para tanto, foi empregado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), uma metodologia estatística que, apesar de muito conhecida na Ciência e Tecnologia de Alimentos, é pouco aplicada dentro da Microbiologia de Alimentos. A utilização do DCCR apresenta inúmeras vantagens, tais como: análise de vários fatores simultaneamente, otimização de mais de uma resposta ao mesmo tempo, redução do número de repetições, com consequente redução do tempo de execução das análises e gasto de materiais. Assim, o DCCR torna-se ideal para o desenvolvimento e otimização de novas soluções antibacterianas para o controle de biofilmes formados em superfícies industriais.

Paralelamente, a avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. cassia*, foi testado o seu constituinte majoritário, cinamaldeído, em proporções correspondentes à sua concentração no óleo essencial. Além disso, nesta segunda etapa da tese, além de biofilmes monoespécies, foi formado o biofilme multiespécie, contendo células de EPEC e *L. monocytogenes*.

Observou-se que tanto o óleo essencial de *C. cassia*, quanto o cinamaldeído, apresentaram efeito antibacteriano contra as células em biofilme. Foi possível determinar intervalos de tempo de contato e concentrações capazes de eliminar as células sésseis viáveis presentes no aço inoxidável. O óleo essencial de *C. cassia* e o cinamaldeído apresentaram comportamento

semelhante no que diz respeito à atividade antibacteriana. Este fato é de particular interesse, pois, comprova que a atividade antibacteriana deste óleo essencial pode ser atribuída ao seu composto majoritário. A elaboração de soluções sanitizantes à base de cinamaldeído é uma maneira mais reprodutível de controlar biofilmes, visto que a composição química de óleos essenciais pode variar em razão de inúmeros fatores, como época e local de colheita da planta.

O biofilme multiespécie não interferiu no número de células aderidas, no entanto, fez com que as bactérias utilizadas se tornassem menos resistentes ao óleo essencial de *C. cassia* e ao cinamaldeído, quando comparado com o biofilme monoespécie. *L. monocytogenes* mostrou-se mais resistente que EPEC.

É importante observar que os efeitos antibacterianos das soluções sanitizantes de óleo essencial de *C. cassia* e cinamaldeído ocorreu em superfícies de aço inoxidável condicionadas com alto conteúdo de matéria orgânica (leite integral reconstituído). Não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade anti-biofilme de óleos essenciais nesta condição. Além disso, na maioria das situações, a atividade das soluções mencionadas acima não diferiu da atividade de sanitizantes químicos comerciais (peróxido de hidrogênio e cloreto de alquil dimetil benzil amônio) e foi superior a do hipoclorito de sódio.

De maneira geral, os resultados obtidos nesta tese indicam que óleos essenciais e seus constituintes são opções promissoras para a elaboração de soluções sanitizantes a serem utilizadas no controle de biofilmes bacterianos formados nas superfícies de equipamentos e utensílios utilizados em indústrias de alimentos. Atualmente, pouco são os estudos realizados seguindo esta linha de pesquisa.

Estudos futuros devem envolver outras espécies bacterianas de importância como contaminantes de alimentos, tanto deteriorantes, como patogênicas, além de diferentes óleos essenciais e seus constituintes. Neste

contexto, destaca-se o potencial do óleo essencial de *C. flexuosus*, empregado na primeira parte deste estudo, e do seu composto majoritário citral. Variáveis que interferem no efeito dessas soluções, também, devem ser pesquisadas, como temperatura, concentração e tempo de contato, com o objetivo de reduzir a concentração de óleo essencial ou constituinte necessária para alcançar o efeito antibacteriano desejado, eliminando o problema causado pelo forte odor dessas substâncias voláteis quando utilizadas em altas concentrações. A reprodução cada vez mais fiel de condições industriais deve ser buscada para a avaliação da atividade antibacteriana de soluções sanitizantes, uma vez que em ambientes de indústrias de alimentos biofilmes são comunidades microbianas heterogêneas e complexas formadas por diversas espécies de microrganismos.