



JORGE PAMPLONA PAGNOSSA

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE
BIOFILMES DE *Salmonella* sp. A LINALOL,
CITRAL E CINAMALDEÍDO**

LAVRAS - MG

2016

JORGE PAMPLONA PAGNOSSA

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE BIOFILMES DE
Salmonella sp. A LINALOL, CITRAL E CINAMALDEÍDO**

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

Orientadora

Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientador

Dr. Cledir Rodrigues Santos

LAVRAS - MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pagnossa, Jorge Pamplona.

Adaptação e adaptação cruzada de biofilmes de *Salmonella* sp. a linalol, citral e cinamaldeído / Jorge Pamplona Pagnossa. – Lavras : UFLA, 2016.

89 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Compostos Majoritários. 2. Biofilmes. 3. *Salmonella enterica*.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

JORGE PAMPLONA PAGNOSSA

**ADAPTAÇÃO E ADAPTAÇÃO CRUZADA DE BIOFILMES DE
Salmonella sp. A LINALOL, CITRAL E CINAMALDEÍDO**

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

APROVADA em 11 de março de 2016.

Dr. Cledir Rodrigues Santos UFRO

Dr.^a. Graciela S. P. Cifuentes UFRO

Dr.^a. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientador

LAVRAS - MG

2016

Aos meus pais, Jason e Maria Cristina.

Ao meu irmão, Tadeu.

E à minha amada, Tamara.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Santo guerreiro.

A toda minha família, por sempre acreditar em minha capacidade.

A toda a família de minha noiva, Tamara, sogra Irani, avó Ilda, tios, tias e primos, pelo apoio e carinho.

À toda família de minha cunhada Myria, pela solidariedade e amizade.

A todos os professores e servidores da Universidade Federal de Lavras que proporcionaram experiências grandiosas de sabedoria, companheirismo e maturidade. Aos colegas de laboratório e a todos que cooperaram de alguma forma neste trabalho.

A todos os colaboradores da Universidad de La Frontera, pela gentileza e competência. A todas as pessoas especiais que conheci em minha passagem pelo Chile, pela hospitalidade e atenção.

À Capes, Fapemig e CNPq, pelo apoio financeiro.

À secretária Rose, pela prestatividade.

Ao meu coorientador, Cledir, por guiar-me em novos caminhos.

À minha orientadora Roberta, por clarear todo o percurso desta jornada.

A todos, minha sincera gratidão.

RESUMO

A salmonelose é uma toxinfecção que pode ser adquirida pela ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* e sua patogenia é manifestada pela ocorrência de sintomas graves no indivíduo com possibilidade de evolução a óbito. A habilidade de *Salmonella* em formar biofilmes exerce influência no elevado número de surtos de toxinfecções alimentares, pois, dessa forma, aumenta-se a sua resistência e persistência nas superfícies colonizadas. Óleos essenciais e compostos majoritários são vistos como uma alternativa eficaz aos sanitizantes químicos, comuns na indústria de alimentos por atuarem em diversos sítios alvo da célula microbiana. Todavia, compostos majoritários podem ser ativamente consumidos por bactérias em concentrações subletais, tornando-os ineficientes. Dessa forma, no presente trabalho, objetivou-se verificar a ação bactericida dos compostos majoritários de óleos essenciais: cinamaldeído, citral e linalol sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* dos sorotipos Enteritidis e Typhimurium submetidas a estresse subletal e avaliar a cinética de consumo do composto cinamaldeído por *Salmonella*. As menores concentrações capazes de eliminar células planctônicas dos sorogrupos de *Salmonella* foram sob efeito de cinamaldeído e biofilmes sofreram maior inibição com doses de citral. Adaptação em estágio planctônico aumentou a resistência dos biofilmes enquanto que a exposição a concentrações subletais em estágio sésil provocou redução das CMBB. Testes de adaptação cruzada demonstraram que cinamaldeído é eficiente após exposição subletal aos demais compostos majoritários e doses subletais de linalol afetam mecanismos de resistência a citral tornando-o ineficiente. A cinética de consumo de cinamaldeído por sorogrupos de *Salmonella* é dependente da concentração de exposição. Após 8 horas de cultivo, doses subletais alcançaram níveis próximos ao esgotamento e houve diferença entre as médias das áreas obtidas dos dois sorogrupos ($p < 0,05\%$). Já, em doses letais houve conservação significativa das concentrações iniciais de cinamaldeído e as médias não apresentaram diferença ($p < 0,05\%$). Neste estudo, ressalta-se a alta capacidade de resistência adaptativa de biofilmes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e que compostos majoritários de óleos essenciais são eficientes no controle microbiológico desde que utilizados de maneira segura.

Palavras-chave: Compostos Majoritários. Biofilmes. *Salmonella enterica*. Estresse Subletal. HPLC.

ABSTRACT

Salmonellosis is a toxoinfection that may be acquired by food contaminated with *Salmonella*, and its pathogeny is marked by the occurrence of severe symptoms and possible death. Biofilms are bacterial cell aggregates, which produce polymeric substances that form communication networks. The capacity *Salmonella* has of forming biofilm influences the high number of food poisoning outbreaks given that it raises the resistance and persistence on colonized surfaces. Essential oils and major compounds are considered an efficient alternative as common chemical sanitizers in food industry by reaching several targets on the microbial cell. However, bacteria may consume sublethal concentrations of major compounds causing them to become inactive. Thus, this work aimed at verifying the bactericidal effect of planktonic and sessile cells of Enteritidis and Typhimurium *Salmonella enterica* serotypes under sublethal stress conditions, and at evaluating the consumption kinetics of cinnamaldehyde by the same serovars using HPLC. The lowest concentrations capable of eliminating planktonic cells of *Salmonella* serovars were under the effect of cinnamaldehyde and biofilms and suffered inhibition with doses of citral. Adaptation in the planktonic stage rose biofilm resistance whereas the sublethal exposure during the sessile stage reduced MBBC. Cross-adaptation tests showed that cinnamaldehyde is efficient after sublethal exposure of other major compounds, and sublethal doses of linalol affected the resistance mechanisms of Citral, causing them to become ineffective. The kinetics of cinnamaldehyde consumption by *Salmonella* serovars depends on the concentration of exposure. After 8 hours of incubation, sublethal doses were almost depleted and the mean of obtained area showed statistical difference for both serovars ($p < 0.05\%$). In lethal doses, a significant conservation of initial doses of cinnamaldehyde was observed, and the mean of the areas showed no difference ($p < 0.05\%$). This study highlights the high adaptive resistance capacity of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* biofilms on common surfaces of the food industry, as well as the effectiveness of major compounds of essential oils over microbiological control, since their safety for use.

Keywords: Major Compounds. Biofilms. *Salmonella enterica*. Sublethal Stress. HPLC.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Biofilmes na indústria de alimentos	11
2.2	<i>Salmonella enterica</i> sorotipos Enteritidis e Typhimurium	15
2.3	Compostos majoritários de óleos essenciais e sua atividade biológica.....	20
2.4	Adaptação bacteriana a agentes antimicrobianos.....	25
2.5	Identificação e quantificação de compostos majoritários de óleos essenciais e produtos derivados do metabolismo microbiano	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Compostos majoritários de óleos essenciais e microrganismos	29
3.2	Determinação das concentrações mínimas bactericidas de compostos majoritários.....	30
3.2.1	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) das células planctônicas	30
3.2.2	Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB)	31
3.3	Adaptação de <i>Salmonella</i> spp. a concentrações subletais de compostos majoritários de óleos essenciais	32
3.3.1	Adaptação de células planctônicas e formação de biofilme.....	32
3.3.2	Adaptação de células sésseis.....	33
3.3.3	Adaptação cruzada	34
3.4	Quantificação e classificação da capacidade de formação de biofilmes	35
3.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	36
3.6	Análises estatísticas	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1	Concentrações mínimas bactericidas (CMB) e mínimas bactericidas dos biofilmes (CMBB).....	39
4.2	Análise de adaptação e adaptação cruzada	42
4.3	Análise de medidas espectrofotométricas e classificações da capacidade de formação de biofilmes	48
4.4	Análise da cinética do consumo de cinamaldeído por HPLC	51
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE.....	74

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* possuem a capacidade de formar biofilmes nas mais variadas superfícies presentes na indústria de alimentos, representando risco potencial de contaminação do produto final, bem como a para saúde dos consumidores.

A habilidade de *Salmonella* em formar biofilmes exerce influência no elevado número de surtos de toxinfecções alimentares, pois, dessa forma, aumenta-se sua resistência e persistência nas superfícies colonizadas. Os biofilmes são agregados de células bacterianas que produzem substâncias exopoliméricas às quais se acumulam em camadas formando redes de canais de comunicação.

A salmonelose pode ser adquirida pela ingestão de alimentos contaminados por *Salmonella* spp. e sua patogenia é manifestada pela ocorrência de sintomas graves no indivíduo, com possibilidade de evolução a óbito. Uma estimativa é de que 1,2 milhões de casos relacionados à *Salmonella* ocorrem anualmente nos EUA (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2011).

Indústrias alimentícias carecem de medidas eficientes de controle da formação e eliminação de biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios.

Apesar da aplicação de critérios rigorosos na tentativa de controle de contaminações causadas por microrganismos patogênicos, constata-se a ocorrência de microrganismos resistentes aos sanitizantes utilizados, atualmente, na indústria, atribuído ao uso inadequado de substâncias declaradas antimicrobianas.

A busca por alternativas a tais dificuldades e a necessidade de utilização de substâncias que não prejudiquem a saúde da população, acarreta no emprego de elementos naturais conhecidamente eficazes. Nesse contexto, os óleos

essenciais mostram-se como recurso atrativo pela origem de metabólitos secundários vegetais e do comprovado efeito antimicrobiano.

A ação de compostos majoritários de óleos essenciais provoca danos estruturais e funcionais à membrana plasmática das células bacterianas e pesquisas buscam avaliar a eficácia na remoção e prevenção de estabelecimento de biofilmes microbianos em superfícies semelhantes às comuns em ambiente industrial.

Dessa forma, no presente trabalho, objetivou-se verificar e comparar a ação bactericida dos compostos majoritários de óleos essenciais: cinamaldeído, citral e linalol sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, bem como classificar os biofilmes quanto à capacidade de formação. A cinética de consumo de cinamaldeído foi avaliada em concentrações subletais e letais pelos mesmos sorotipos de *Salmonella* utilizando HPLC.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilmes na indústria de alimentos

Os biofilmes são comunidades microbianas organizadas compostas por agregados de células que excretam substâncias poliméricas que, por sua vez, podem formar camadas. Iniciados pela adesão em superfícies bióticas ou abióticas, os biofilmes estruturam-se em ambiente dinâmico e homeostático, por meio de canais próprios (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007; SUTHERLAND, 2001) que possibilitam fluxo de líquido e gases, circulação de nutrientes e eliminação de compostos (MCLANDBOROUGH et al., 2006; STOODLEY et al., 2002).

De 95 a 99% dos microrganismos ocorrem na forma de biofilmes, desde que haja condições que suplantem seu crescimento (LYNCH; ROBERTSON, 2008). Os exopolissacarídeos atuam na fixação e proteção das células, conferindo uma barreira resistente a antimicrobianos e vantagens contra situações de diminuição de água e nutrientes (KIVES; ORGAZ; SANJOSÉ, 2006). Características estruturais do biofilme como capacidade de coesão, morfologia e fisiologia são determinadas pela composição da matriz de substâncias extracelulares poliméricas que também é considerada como constituinte do biofilme (HOOD; ZOTOLLA, 1995).

Sua composição estrutural tem como água sua fração predominante, variando de 70% a 95% (CHARACKLIS, 1981; FLEMMING, 1993) e apenas uma parcela mínima corresponde à massa de microrganismos, ainda que sejam os produtores das substâncias poliméricas extracelulares (PEREIRA, 2001), estas que representam de 70% a 90% da matéria orgânica do peso seco do biofilme (FLEMMING, 1993).

Biofilmes bacterianos possuem vantagens adaptativas e reprodutivas quando comparados com biofilmes onde predominam outros microrganismos, tais como fungos, protozoários e microalgas, como síntese elevada de compostos, tamanho reduzido e estruturas extracelulares especializadas (CHARACKLIS, 1990).

Os biofilmes são formados a partir da adsorção de moléculas orgânicas, como resíduos proteicos ou lipídicos, ou inorgânicas a superfície abiótica, constituindo a camada condicionante (WATNICK; KOLTER, 2000). A adesão por colonizadores primários caracteriza-se por apresentar interações iônicas negativas e/ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionante (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990).

A construção de um biofilme é dividida em etapas: adesão reversível seguida por adesão irreversível, maturação e desprendimento de fragmentos; entretanto, a remoção dos microrganismos, ao longo do desenvolvimento do biofilme, é um evento recorrente.

No início da formação, ocorre a participação ativa de estruturas de adesão, como fímbrias e flagelos que se encontram presentes na superfície celular (CLONTS, 2008; FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). A cinética em que ocorre a formação inicial do biofilme depende de fatores como disponibilidade de nutrientes e da afinidade das moléculas com a superfície. Características como rugosidade, carga e energia livre são fundamentais para a adesão em superfícies abióticas (MARSHAL; BLAINEY, 1990).

A adesão reversível entre o microrganismo e a superfície envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas, configurando uma interação inicial fraca onde as bactérias são facilmente removidas (OLIVEIRA et al., 2010). Já, a adesão irreversível resulta de interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, ligações covalentes e iônicas

que fortalecem a fixação entre as células e a superfície além da influência direta de apêndices celulares, como pili, e da produção adesinas e exopolissacarídeos (EPS) (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

O processo de maturação do biofilme é constituído por significativo aumento da densidade populacional, produção e adsorção das substâncias presentes na matriz de EPS que funcionam como adesivos dos microrganismos colonizadores secundários (CLONTS, 2008), possibilitando o acréscimo em sua espessura (CHENG et al., 2007). São fatores determinantes na maturação do biofilme a difusão de oxigênio, osmolaridade, pH interno a disponibilidade e transporte de nutrientes, bem como a excreção de substâncias tóxicas às células (CARPENTIER; CERF, 1993; O'TOOLE; KOLTER, 1998).

Após a fase de amadurecimento, pode ocorrer um evento de destacamento de células do biofilme marcando a transição do estado sésil para o planctônico (CLONTS, 2008), fato que possibilita colonizar novas superfícies, disseminando bactérias patogênicas (WALTER et al., 2013). O despreendimento das células do biofilme é dado por mecanismos físicos como descamação de grandes frações do biofilme, perda contínua de aglomerados de células por erosão ou remoção por colisão de partículas sobre a superfície (DERLON et al., 2008). Outros fatores, como ação de enzimas degradantes da matriz, resposta fenotípica e moléculas sinalizadoras podem ativar mecanismos de liberação das células sésseis (PEREIRA, 2014).

A propagação de biofilmes em equipamentos utilizados em indústrias alimentícias, principalmente nos ambientes de processamento, tem elevado as chances de contaminação por microrganismos, resultando em reveses no âmbito econômico e da saúde pública. Estudos mostram que os biofilmes provocam deterioração nos alimentos, diminuição da vida útil do produto e transmissão de doenças aos consumidores (MANSFELD, 2007; SCHNEIDER, 2007).

Além de diminuição da qualidade dos produtos, outros possíveis prejuízos veiculados pela formação de biofilmes incluem reduções no desempenho de equipamentos e deteriorações de superfícies, provocando retenção e acúmulo de microrganismos (OLIVEIRA, 2010).

A prevenção da instalação e eliminação das comunidades microbianas tem se tornado preocupação constante nos ambientes de indústrias alimentícias (KUMAR; ANAND, 1998). A higienização ineficiente e a inadequada remoção dos microrganismos das superfícies e instalações que entram em contato com os produtos afetam, diretamente, sua qualidade com a possibilidade de contaminação do consumidor final (BOS et al., 2000). Sendo assim, as falhas na higienização das superfícies possibilitam a aderência dos resíduos orgânicos, geralmente derivados de leite ou de carnes, formando o filme condicionante (KUMAR; ANAND, 1998; WATNICK; KOLTER, 2000) e tornando os equipamentos potenciais fontes de contaminações.

As propriedades das superfícies, como carga elétrica, capacidade de retenção de água, energia livre e topografia, constituem parâmetros importantes para a adesão das células e formação do biofilme (PLOUX et al., 2007). Dentre as superfícies utilizadas nas indústrias, destacam-se o aço inoxidável (fabricação de equipamentos), teflon (juntas e acessórios de equipamentos) e polipropileno (tanques, conexões, tubos e superfícies de processamento de alimentos). Estudos mostram que as células microbianas possuem mais facilidade de aderência em superfícies hidrofílicas como aço inoxidável e vidro, do que em superfícies hidrofóbicas, como borracha e plásticos (SHI; ZHU, 2009).

Praticamente, todos os microrganismos possuem potencial para formar biofilmes, desde que encontrem condições ambientais adequadas para seu desenvolvimento (MCLANDSBOROUGH et al., 2006). Nas indústrias alimentícias, os deteriorantes patogênicos mais frequentemente identificados são: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia*

enterolitica, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

A capacidade de *Salmonella* em formar biofilmes exerce influência para o elevado número de surtos de toxinfecções alimentares, pois, dessa forma, aumenta-se sua resistência e persistência nas superfícies colonizadas. Componentes celulares estruturais como fímbrias e pili são considerados fundamentais na formação dos biofilmes (STEENACKERS et al., 2012). Uma vez estabelecido o biofilme, as células mostram-se mais protegidas contra agressões ambientais, fato que torna mais difícil sua eliminação, proporcionando também adaptação a diferentes fatores de estresse, dentre eles a exposição a sanitizantes e antibióticos (BURMØLLE et al., 2010).

A remoção e o controle dos biofilmes nas indústrias alimentícias devem ser baseados nos critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1988). No entanto, ainda se verifica a ocorrência de microrganismos resistentes aos sanitizantes utilizados atualmente na indústria, atribuída ao uso inadequado de antibióticos e substâncias antimicrobianas, bem como da transmissão de genes de resistência entre microrganismos (BORGES et al., 2013).

Nesse contexto, dentre os métodos alternativos de combate a biofilmes, os sanificantes a base de óleos essenciais e seus compostos entram em evidência, devido à tendência à inclusão, cada vez maior, de produtos naturais no mercado, uma vez obtido do metabolismo secundário das plantas.

2.2 *Salmonella enterica* sorotipos Enteritidis e Typhimurium

As bactérias do gênero *Salmonella* são relatadas historicamente como patogênicas, desde finais do século XIX. Eberth, em 1880, foi o primeiro a isolar cepas de *Salmonella* Typhi a partir de baço e linfonodos de enfermos e Gaffky

realizou a descrição morfológica em 1884 (ZANCAN, 1998). Em 1885, Daniel E. Salmon isolou e caracterizou o agente do paratifo suíno, denominado de *Bacterium suispestifer*. Atualmente, duas espécies de *Salmonella* são reconhecidas: *Salmonella bongori* e *S. enterica* onde 99% dos 2.579 sorotipos identificados (2.557) pertencem à espécie *S. enterica* (SCHAECHTER et al., 2002).

Salmonella spp. são bastonetes Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, aeróbias facultativas, não formadoras de esporos, catalase-positivas, oxidase-negativas e redutoras de nitratos a nitritos (JAY, 2005). Bactérias do gênero *Salmonella* se multiplicam em temperaturas entre 7°C e 49,5°C, sendo 37°C a temperatura ideal para seu desenvolvimento (GERMANO; GERMANO, 2008) e pH entre 4 a 9, preferencialmente próximo à neutralidade (JORGE, 2012).

A constituição genética de *Salmonella* permite sua adaptação à ampla variedade de ambientes, incluindo hospedeiros mamíferos e não mamíferos, assim como reservatórios não animados (SÁNCHEZ-VARGAS; ABU-EL-HAIJA; GOMEZ-DUARTE, 2011). Os principais antígenos que distinguem suas variedades sorológicas são o somático (O), flagelar (H) e capsular (K). A grande diversidade do gênero é conferida pela capacidade de sofrer variação antigênica, habilidade de recombinação e duplicações de genes, além de mutações pontuais (SCHAECHTER et al., 2002).

Salmonella spp. é um dos principais agentes patogênicos de origem alimentar. A salmonelose pode ser adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, sendo as carnes de aves, ovos e produtos cárneos a via mais comum de transmissão a humanos (TUNON et al., 2008). A transmissão de *Salmonella* é um evento importante do ciclo de vida do patógeno e representa uma das chaves para a redução e controle da doença (MONACK, 2012). O potencial de transmissão é afetado por vários parâmetros do hospedeiro, como a

genética, o estado imunológico e a microbiota intestinal (BARROW; JONES; THOMSON, 2010).

Segundo o centro de vigilância epidemiológica dos EUA, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), é estimado que 48 milhões de doenças transmitidas por alimentos ocorram a cada ano. Entre as zoonoses bacterianas mais notificadas estão salmonelose e campylobacteriose, seguidas por yersiniose (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Em agosto de 2014, o CDC anunciou a ocorrência de um surto provocado pela bactéria *Salmonella enterica* sorovar Braenderup presente em margarina vegetal comercializada em quatro estados nos EUA com registro inicial de quatro pessoas infectadas, resultando na retirada de lotes inteiros do mercado. Outra cepa, *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg, isolada a partir de carne moída de aves, foi responsável pela contaminação de nove pessoas em uma casa de detenção no estado do Tennessee, EUA, em fevereiro do mesmo ano, sendo que dois desses indivíduos apresentaram cepas com perfis de multirresistência a antibióticos.

No Brasil, detecta-se ineficiência nos registros de dados epidemiológicos de toxinfecções de origem alimentar. Mesmo com a dificuldade de coleta de notificações, acredita-se que a ocorrência de doenças provocadas pelas bactérias do gênero *Samonella* seja relevantemente alta entre a população (SHINOHARA et al., 2008). No estado do Paraná, uma avaliação epidemiológica de surtos de salmoneloses, ocorridos no período de 1999 a 2008, relatou 286 surtos sendo que, das 5.641 pessoas expostas, 2.027 (35,9%) manifestaram os sintomas da doença e 881 (16,3%) foram hospitalizadas. Os alimentos derivados de ovos e carnes foram apontados como os principais veículos da doença e *S. Enteritidis* foi a cepa mais identificada (KOTTWITZ et al., 2010).

Estudos de determinação da quantidade de *Salmonella* spp. presente em alimentos envolvidos em surtos que ocorreram no Rio Grande do Sul, em 2005, identificaram *S. Enteritidis* como sendo o principal causador de salmoneloses. O patógeno foi detectado em alimentos à base de ovos, maionese e frango, concluindo-se que a maioria das contaminações ocorreu por contaminação cruzada e armazenamento em temperatura inadequada. (MURMANN et al., 2008). Nesse contexto, a contaminação cruzada é relatada como uma das principais causas de surtos de origem alimentar envolvendo *Salmonella* (TOOD et al., 2009).

A salmonelose manifesta-se por gastroenterite, provocando náusea, vômito e diarreia causados, principalmente, pelos sorotipos de *S. enterica*, subespécie *enterica*; infecção focal do endotélio vascular provocada pelos sorotipos Choleraesuis e Typhimurium; osteomielite em pacientes com anemia falciforme causada, principalmente, pelo sorotipo Typhimurium; e febre tifoide, pelos sorotipos Typhi e Paratyphi A e B (SCHAECHTER et al., 2002).

A patogênese da doença é caracterizada pela capacidade que o microrganismo possui em atingir um local adequado no hospedeiro para seu crescimento, replicação e disseminação pelas células do hospedeiro (ZACHARY, 2013). Os microrganismos utilizam células M epiteliais como via de invasão, associadas aos tecidos linfoides (CLARK; JEPSON, 2003), e, posteriormente, atingem a região subepitelial das células intestinais (BHUNIA, 2008). A penetração nas vilosidades ocorre por endocitose e, por serem resistentes ao conteúdo lisossomal e aos peptídeos antibacterianos sintetizados pelas células epiteliais, tendem a migrar até a lâmina basal, onde chegam à lâmina própria. A resposta inflamatória não é suficiente para bloquear a colonização tecidual, e a alta produção de anticorpos heterófilos para os locais de infecção bacteriana resulta em maior lesão do tecido, já induzida pelo patógeno (CHEMINAY; CHAKRAVORTTY; HENSEL, 2004).

Pesquisas realizadas visando a detectar *Salmonella* spp. demonstram que ovos são importantes reservatórios de *S. Enteritidis*, pois a bactéria pode colonizar o ovário de galinhas poedeiras, permitindo a contaminação, ainda no oviduto, do animal antes da formação da casca. Dessa forma, os ovos armazenados à temperatura ambiente representam potencial fonte de disseminação, podendo conter uma população de até 10^{11} células por ovo (BHUNIA, 2008).

O contato do alimento na fase de processamento industrial com biofilmes de *Salmonella* spp. constitui a forma de contaminação mais comum de superfícies pelo patógeno. Seu estabelecimento gera fonte de transmissão em potencial tanto para trabalhadores industriais como para consumidores finais do produto.

Os patógenos conseguem atravessar as fronteiras geográficas mais facilmente, devido a globalização do comércio e as viagens internacionais, modificando, assim, o perfil epidemiológico de muitas doenças (LIU et al., 2003). Assim, a notificação e os registros epidemiológicos são ferramentas importantes como fonte de informações para que os órgãos competentes de fiscalização e controle possam realizar o mapeamento das doenças, a fim de fornecer subsídios para o desenvolvimento de medidas políticas sanitárias, legislativas, priorização de áreas de pesquisa e avaliação de programas de controle de surtos epidêmicos (SHINOHARA et al., 2008).

Na avicultura, mesmo nas granjas mais tecnificadas, um dos problemas sanitários mais temidos é o surgimento de salmonelose, no plantel, seja causado por *Salmonella* Gallinarum, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium* ou *S. Enteritidis* (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Entre as décadas de 1970 e 1980, o principal sorotipo isolado tanto em amostras de seres humanos quanto de fontes alimentares foi *S. Typhimurium*. No entanto, na década de 1990, destacou-se o sorotipo *S. Enteritidis*, que passou a ser o mais isolado (SILVA;

DUARTE, 2002). Nos anos subsequentes (1995-1999), esse sorotipo continuou sendo o mais isolado em órgãos de aves de postura e corte (ANDREATTI FILHO et al., 2001).

2.3 Compostos majoritários de óleos essenciais e sua atividade biológica

Em vista dos problemas de resistência microbiológica a antibióticos e desinfetantes convencionais, o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudado, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (ANDRADE et al., 2012).

Os óleos essenciais de plantas aromáticas e condimentares surgem como medida alternativa eficaz no controle e remoção de biofilmes no setor alimentício, devido as suas conhecidas propriedades antimicrobianas de seus princípios ativos. O uso de óleos essenciais como bioconservantes é de grande importância, principalmente na indústria de alimentos visto que os consumidores preferem aditivos naturais ao invés de sintéticos (LANG; BUCHBAUER, 2012).

Também chamados de óleos voláteis ou etéreos, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente, são oriundos do metabolismo secundário das plantas encontrados em folhas, flores, sementes, caule e raiz (SIMÕES; SPITZER, 2004). Todos os órgãos de uma planta são capazes de sintetizar óleos essenciais, porém sua composição pode variar, segundo a localização, estágio de desenvolvimento e condições ambientais (OUSSALAH et al., 2007).

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os subprodutos vegetais obtidos mediante extração pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por processamento dos pericarpos carnosos de frutos. Sua constituição química é

caracterizada por terpenoides e fenilpropanoides (SIMÕES; SPITZER, 2004). Os terpenoides são encontrados com maior frequência e compreendem todas as substâncias, cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e são sintetizadas pela via do mevalonato. Os compostos terpênicos comumente encontrados em óleos essenciais são os monoterpenos (cadeia de dez carbonos), mais identificadas nos óleos essenciais (90%), e os sesquiterpenos (cadeia de quinze carbonos), formados por duas e três unidades de isopreno respectivamente. A origem dos metabólitos secundários ocorre a partir da via glicolítica por dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (SANTOS, 2004).

Dada a variedade de grupos compostos químicos presentes nos óleos essenciais, acredita-se que a atividade antimicrobiana seja atribuída a mais de um mecanismo específico e que o efeito ocorra em vários sítios celulares (SESSOU; FAROUGOU; SOHOUNHLOUÉ, 2012). O desempenho antimicrobiano de óleos essenciais sobre biofilmes vem sendo avaliado, procurando comprovar, cada vez mais, a significância da utilização desses compostos como agentes sanitizantes na indústria alimentícia (CHORIANOPOULOS et al., 2008).

A permeabilidade da membrana da célula bacteriana é influenciada pela sua composição e da hidrofobicidade dos compostos que a atravessam. Em razão do caráter hidrofóbico dos óleos essenciais, a ação desses compostos provoca danos estruturais e funcionais à membrana plasmática das células bacterianas (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004; SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994) alterando sua estrutura e fluidez (PASQUA et al., 2007), e, como consequência, há dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do pool de ATP, desordem do pH interno e do potencial elétrico e perda de metabólitos e íons, como os de potássio e fosfato (BAKKALI et al., 2008; LAMBERT et al., 2001).

Os óleos essenciais são misturas naturais complexas constituídas por 20 a 60 componentes presentes em diferentes concentrações. Geralmente, os componentes predominantes, denominados majoritários, determinam suas propriedades biológicas (BAKKALI et al., 2008).

A espécie *Cinnamomum cassia* é uma planta aromática, medicinal pertencente à família Lauraceae, conhecida no Brasil como canela, canela-da-china, cassia ou cassia-da-china. O emprego medicinal do vegetal é, principalmente, no tratamento de gastrite, distúrbios da circulação e doenças inflamatórias. *C. cassia* é considerada uma das especiarias mais antigas e utilizadas no mundo, em alimentos, bebidas e cosméticos (OLIVEIRA, 2011). A parte da planta de onde é mais comumente extraído o óleo essencial é seu caule; que pode ser encontrado em cascas, pequenos pedaços ou em pó (KWON; YU; PARK, 2003).

O óleo essencial de canela apresenta diferenças em sua composição quando obtido em regiões distintas da planta. Quando obtido da casca, observa-se prevalência do composto aldeído cinâmico (ou cinamaldeído), seguido do eugenol com porcentagens de 55% e 12% respectivamente, e quando obtido de folhas da canela, encontra-se o eugenol (94%) como composto majoritário e traços de aldeído cinâmico (1%) (KOKETSU et al., 1997). O óleo obtido da casca é utilizado na aromatização de alimentos, ao passo que o das folhas, na cosmética e na aromaterapia (GROSSMAN, 2005). Unlu et al. (2010) obtiveram como composto majoritário (E)-cinamaldeído (68.95%) identificado em óleo de casca de *C. zeylanicum* originária da Turquia.

A atividade antibacteriana de *C. cassia*, é comprovada tanto do óleo essencial quanto do composto majoritário. Estudos demonstram que óleo essencial de *C. cassia*, bem como o cinamaldeído puro, são igualmente efetivos na inibição do crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio*

parahaemolyticus e *S. Typhimurium* (OOI et al., 2006), sendo o cinamaldeído capaz de inibir a divisão celular quando testado contra *B. cereus* (KWON; YU; PARK, 2003), e de promover inibição do metabolismo energético de *L. monocytogenes* e *L. sakei* quando expostas a concentrações bactericidas de cinamaldeído (GILL; HOLLEY, 2004).

Cymbopogon citratus, popularmente conhecido no Brasil como capim-limão ou também como erva-cidreira, capim-cidreira capim-cheiroso e capim-cidrão, é uma espécie vegetal pertencente à família das Poáceas. Herbáceo, perene e rasteiro, o capim-limão não forma caule e exibe folhas longas recobertas por camada fina de cera. (CASTRO; RAMOS, 2003). No Brasil, é comum o consumo da infusão de suas folhas por apresentarem propriedades diuréticas, sedativas, antipiréticas e antirreumáticas (FIGUEIREDO; DELACHIAVE; MING, 2002).

O óleo essencial de capim-limão possui odor marcante similar a limão e é aplicado como aromatizante em perfumaria e cosmética. Porém, seu maior emprego tem sido na indústria farmacêutica, fornecendo material para síntese de compostos como iononas e vitamina A (GUIMARÃES, 2007).

O citral é constituinte majoritário do óleo de capim-limão sendo o responsável por muitas atividades de interesse econômico, tais como antimicrobianas, repelentes de insetos, entre outras aplicações na indústria farmacêutica. Além do citral, a composição química do óleo de capim-limão é relatada, apontando vários aldeídos, como o citronelal, isovaleraldeído e decilaldeído; bem como cetonas e álcoois como o geraniol, nerol e farnesol. (COSTA et al., 2005; PEREIRA, 2006).

O citral difere isomericamente em duas formas: geranial ((2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral A ou isômero E) e neral ((2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral B ou isômero Z) (EL FATTAH et al., 1992). Iijima et al. (2006) propõe uma rota bioquímica para a formação do citral, a partir do geranil

difosfato (GPP), onde este sofre reação catalisada pela geraniol sintase (GES), sendo convertido em geraniol. O geraniol é, então, oxidado pela ação da geraniol desidrogenase (GEDH1) originando o geranial, e que, por meio de uma tautomerização ceto-enólica que facilita a rotação da ligação entre os carbonos dois e três, o geranial que possui a configuração E é convertido em neral configuração Z.

O manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), pertencente à família Lamiaceae, faz parte de um grupo de plantas medicinais e aromáticas de grande valor econômico, muito utilizado para diversos fins: ornamental, condimentar, medicinal, aromático, na indústria de perfumaria e de cosméticos. Trata-se de espécie herbácea, fortemente aromática, que pode ser anual ou perene, conforme o local de plantio. A qualidade da planta de manjeriço é definida pela composição de seu óleo essencial (CARVALHO FILHO et al., 2006).

O composto majoritário linalol é um constituinte químico de grande valor no mercado de cosméticos e perfumaria. Na medicina, seu óleo essencial possui potencial comprovado com sucesso como sedativo (SUGAWARA et al., 1998), anticonvulsivo (ELISABETSKY; BRUM; SOUZA, 1999) e antinociceptivo (VENÂNCIO, 2006). Efeitos letais em diversos organismos como acaricida (PRATES et al., 1998), e microrganismos como bactericida, fungicida (BELAICHE; TANTAOUI-ELARAKI; IBRAHIMY, 1995) e anti-giardial (ALMEIDA et al., 2007).

O efeito bactericida do composto majoritário linalol há tempos vem sendo descrito como promissor. Mazzanti, Battinelli e Salvatore (1998) utilizaram óleos essenciais de *Hyssopus officinalis* L. variação decumbens, com alto teor de linalol (51.7%) em testes de inibição microbiológica e detectaram doses diminutas necessárias para a inibição de bactérias Gram-positivas e negativas.

2.4 Adaptação bacteriana a agentes antimicrobianos

Óleos essenciais e compostos majoritários são vistos como alternativas eficazes aos sanitizantes químicos comuns na indústria de alimentos por atuarem em diversos sítios alvo da célula microbiana. Todavia, compostos majoritários podem ser ativamente absorvidos por bactérias em concentrações subletais tornando-os ineficientes. Ademais, tais cepas sobreviventes, tanto em estágio planctônico ou sésil, serão capazes de expressar proteínas, enzimas e outros componentes em resposta condicionada à exposição subletal.

Bactérias desenvolvem várias estratégias e alternativas para a sobrevivência e adaptação às condições adversas dos ambientes que colonizam, tais como o estresse sofrido durante o processamento de alimentos. A natureza específica dessas condições adversas é dependente da composição do produto, condições de estocagem do material em etapas iniciais e finais do processamento, adição de conservantes, e detalhes específicos dos regimes de limpeza dos ambientes de processamento de alimentos (VAN DER VEEN; ABEE, 2011). Durante processos de higienização de linhas de produção e superfícies de manipulação de alimentos, tais bactérias podem ser expostas a concentrações subletais ou subinibitórias de sanitizantes. Uma das respostas mais comuns que bactérias utilizam para adaptarem-se a ambientes hostis é a resposta SOS (ERILL; CAMPOY; BARBÉ, 2007).

A resposta SOS foi apontada como um componente ativo na indução da resistência a fatores estressantes às bactérias após a exposição a tais agentes e essa indução, possivelmente, geraria diversidade genética que resultaria em subpopulações resistentes a esse estresse. (VAN DER VEEN; ABEE, 2011). É constituída, de forma geral, em proteínas envolvidas no reparo de DNA, tais como exonucleases, helicases e recombinases, ou proteínas envolvidas na síntese de DNA, como DNA polimerases. Nas indústrias de alimentos, são utilizados

vários tratamentos de atividade bactericida que promovem dano ao DNA, seja de superfície como radiação ultravioleta (UV) ou agentes sanitizantes com compostos oxidantes. A ativação da resposta SOS pode proporcionar uma condição de proteção e adaptação cruzada às cepas que sobreviveram a tais tratamentos. Uma relação de resposta SOS mediada por estímulo foi estabelecida por *Salmonella* Typhimurium em ambiente do trato gastrointestinal humano, onde observou-se a aquisição de resistência ao dano oxidativo à estrutura do DNA bacteriano por sais biliares (PRIETO; RAMOS-MORALES; CASADESÚS, 2006).

De fato, a resistência das bactérias aos antimicrobianos é oriunda de mecanismos ligados à espécie bacteriana e ao estado fisiológico, sejam herdados e não herdados (LEVIN; ROZEN, 2006). Estudos demonstram que determinados sanitizantes contribuem para o surgimento de microrganismos resistentes por pressão seletiva após exposição regular (LANGSRUD et al., 2003). Bactérias de mesmo gênero e espécie podem apresentar diferentes graus de sensibilidade ao mesmo agente desinfetante. Além disso, sanitizantes com formulações químicas similares, porém não idênticas, têm eficácia diferenciada contra as mesmas bactérias (SANDER et al., 2002). Assim, é possível que a resistência dos microrganismos em biofilme a sanitizantes também possa ser consequência da exposição prolongada a doses subletais desses compostos (DAVIDSON; HARRISON, 2002).

Apesar da base da resistência bacteriana a antibióticos ser bastante conhecida, a resistência a sanitizantes e conservantes de alimentos ainda é pouco estudada. Os mecanismos bioquímicos exatos de adaptação e de resistência permanecem largamente desconhecidos (BRAOUDAKI; HILTON, 2005; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; RUSSELL, 2003). O fenômeno de resistência cruzada pode ocorrer quando diferentes agentes antimicrobianos têm o mesmo alvo na célula, atingem rota comum de acesso aos respectivos alvos ou

iniciam uma via comum para a morte celular, ou seja, o mecanismo de resistência é o mesmo para mais de um agente antibacteriano (CHAPMAN, 2003). Evidências moleculares e fisiológicas apontam que bactérias patogênicas de origem alimentar podem suportar e adaptarem-se a estresses subletais e, como consequência, tornarem-se resistentes a níveis anteriormente letais do agente estressante ou exibir proteção cruzada contra outros (LANDAU; SHAPIRA, 2012).

2.5 Identificação e quantificação de compostos majoritários de óleos essenciais e produtos derivados do metabolismo microbiano

A grande área de estudo da metabolômica aborda a determinação e quantificação simultânea de compostos metabólicos produzidos e modificados por organismos vivos incluindo peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcaloides e minerais (JEWETT; HOFMANN; NIELSEN, 2006). Dessa forma, ela vem sendo aplicada na área da Ciência dos Alimentos, por meio do monitoramento da qualidade, da segurança e da microbiologia tanto da matéria-prima quanto do produto final (CEVALLOS-CEVALLOS et al., 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia gasosa (GC) e a eletroforese capilar (CE), hoje são as técnicas de separação mais utilizadas para a quantificação de compostos de interesse. Para a detecção, as técnicas mais comuns incluem espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (MNR) e espectrometria de infravermelho próximo (NIR) (MOZZI et al., 2013).

Em HPLC, podem ser obtidas separações altamente eficientes, rápidas e sem tratamentos prévios rigorosos da amostra. Por essa técnica, diferentes compostos são separados por sua interação diferenciada com uma fase μm . Dessa forma, cada *peak* cromatográfico possui um tempo de retenção específico

correspondente a um metabólito, sendo que sua área relativa permite calcular a concentração de cada metabólito presente na amostra (MOZZI et al., 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG, onde foram realizadas as análises microbiológicas e no Laboratório de Química Ambiental do Departamento de Ciências Químicas e Recursos Naturais da Universidade de La Frontera (UFRO), em Temuco, Chile, onde também foram realizadas as análises de HPLC.

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas: Análises microbiológicas (reativação, estocagem e padronização de cepas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; determinação da concentração mínima bactericida das células planctônicas e sésseis; adaptação e adaptação cruzada; quantificação e classificação de biofilmes) e Quantificação do consumo de cinamaldeído por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* por HPLC.

3.1 Compostos majoritários de óleos essenciais e microrganismos

Os compostos cinamaldeído, citral e linalol foram adquiridos pela empresa Sigma-Aldrich.

As cepas bacterianas *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis S64 e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium S190 utilizadas foram cedidas pelo LABENT (Laboratório de Enterobactérias) da FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz). As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; 100 mL de água destilada, pH 7,0).

As culturas foram descongeladas à temperatura ambiente e reativadas inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37°C/24h. A padronização dos inóculos foi realizada mediante curva de crescimento.

Após a reativação, alíquotas de 50 µL dos inóculos, foram transferidas para 300 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubadas a 37°C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro (D.O. 600 nm) e plaqueamento em Ágar Triptona de Soja (TSA) com incubação a 37°C/24h. As culturas foram padronizadas em 10^8 UFC mL⁻¹.

3.2 Determinação das concentrações mínimas bactericidas de compostos majoritários

A concentração mínima bactericida dos compostos majoritários, cinamaldeído, citral e linalol foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003) com adaptações.

3.2.1 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) das células planctônicas

Foram obtidas soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e de compostos majoritários nas concentrações de 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00% (v/v). Alíquotas 150 µL das soluções foram adicionadas nas cavidades e inoculados 10 µL da cultura padronizada. As microplacas foram incubadas a 37°C/24h. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas de três alíquotas de 10 µL das culturas de cada poço em TSA

utilizando a técnica de microgotas; as placas foram incubadas a 37°C/24h. Após incubação, foi determinada a concentração mínima bactericida dos componentes majoritários, como sendo sua menor concentração capaz de promover a ausência de crescimento de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* em placa.

O experimento foi realizado em triplicata e três repetições utilizando dois controles para cada composto majoritário testado; sendo um controle negativo, contendo 150 µL de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v) e composto majoritário e um controle positivo, contendo 150 µL TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v) e 10 µL de inóculo padronizado.

3.2.2 Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB)

Biofilmes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram formados nas cavidades das microplacas pela inoculação de alíquotas de 50 µL de cultura padronizada em 150 µL de TSB e incubação a 37°C/48h. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v) para a remoção das células não aderidas.

Após a formação dos biofilmes, alíquotas de 200 µL de soluções aquosas contendo 0,5% de Tween 80 (v/v) e componentes majoritários foram adicionadas nas cavidades. Foram utilizadas as concentrações de 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,00 % para cinamaldeído e citral e 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00 e 8,00 %, para linalol. Após 20 minutos de contato, as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Às cavidades foram adicionados 200 µL de TSB e as microplacas incubadas a 37°C/24h. Após esse período, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 µL das culturas de cada cavidade em placas

contendo TSA empregando-se a técnica de microgotas, com incubação a 37°C/24h. O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

As menores concentrações dos componentes majoritários onde não foi observado crescimento em placas foram denominadas de Concentração Mínima Bactericida do Biofilme.

3.3 Adaptação de *Salmonella* spp. a concentrações subletais de compostos majoritários de óleos essenciais

Culturas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram expostas a concentrações subletais dos componentes majoritários. Estas foram definidas como ¼ da CMB obtidas (DI PASQUA et al., 2010).

3.3.1 Adaptação de células planctônicas e formação de biofilme

Alíquotas de 150 µL de soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e compostos majoritários, nas concentrações subletais, foram adicionadas nas cavidades, inoculados 50 µL das culturas padronizadas e as microplacas incubadas a 37°C/48h. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v) para a remoção das células não aderidas.

Os biofilmes formados com as células adaptadas foram desafiados a diferentes concentrações dos componentes majoritários. Alíquotas de 200 µL de soluções aquosas acrescidas de 0,5% de Tween 80 (v/v) de componentes majoritários nas concentrações de 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00%, para cinamaldeído: 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00 e 6,00% de citral e 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00 e 8,00% de linalol foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de contato, as soluções foram

removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e as microplacas foram incubadas a 37°C/24h. Após esse período, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 µL das culturas tratadas em TSA pela técnica de microgotas, seguido de incubação a 37°C/24h e, assim, determinada a concentração dos compostos majoritários capazes de eliminar as células sésseis de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* que sofreram adaptação em estágio planctônico.

3.3.2 Adaptação de células sésseis

Os biofilmes nas cavidades das microplacas foram formados pela adição de 150 µL de TSB e 50µL de culturas padronizadas e incubação a 37°C/48h. Após a incubação, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas por três vezes com solução salina.

Os biofilmes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram expostos por 12h a concentrações subletais de compostos majoritários, ¼ da CMBB para *S. Enteritidis* e ⅛ para *S. Typhimurium*, homogeneizados em TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 (v/v). Após incubação, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas com solução salina por três vezes.

Os biofilmes adaptados foram desafiados a diferentes concentrações dos componentes majoritários. Alíquotas de 200 µL de soluções aquosas acrescidas de 0,5% de Tween 80 (v/v) de componentes majoritários nas concentrações de 0,015; 0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00% para cinamaldeído e citral e 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00e 8,00% de linalol foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de contato, as soluções foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (m/v). Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e as microplacas foram incubadas a 37°C/24h. Após esse período, realizou-se o plaqueamento de

alíquotas de 10 µL das culturas tratadas em TSA pela técnica de microgotas seguido de incubação a 37°C/24h e, assim, determinada a concentração dos compostos majoritários capazes de eliminar as células sésseis de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* que sofreram adaptação em estado sésbil.

3.3.3 Adaptação cruzada

Para a verificação de ocorrência de adaptação cruzada, os compostos majoritários cinamaldeído, citral e linalol foram acrescidos a soluções de TSB com Tween 80 a 0,5 % (v/v) em concentrações subletais para o cultivo de células de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e foram adicionadas 150 µL das soluções e 50 µL das culturas padronizadas nas cavidades das microplacas de poliestireno. Após o período de 48h a 37°C, os meios de cultivo foram removidos e as cavidades foram lavadas três vezes com solução de NaCl a 0,85% (v/v). A etapa seguinte de exposição prosseguiu-se de modo a testar as colônias adaptadas frente aos outros dois compostos majoritários diferentes ao qual foi cultivada. Ou seja, uma cepa de *Salmonella enterica* cultivada por 48h em TSB acrescido 0,5% de Tween 80 (v/v) contendo concentrações subletais de um dado composto majoritário, foi submetida a um teste frente aos outros dois compostos majoritários utilizados no presente estudo.

As soluções foram preparadas em água destilada estéril acrescida de 0,5% de Tween 80 (v/v) e homogeneizadas por agitação vigorosa em vórtex por 2 minutos. Foram utilizadas as seguintes concentrações para cinamaldeído e citral (%) (v/v): 0,06; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 e para linalol (%) (v/v): 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00. Alíquotas de 200 µL das soluções de compostos majoritários foram adicionadas nas cavidades. Após 20 minutos de exposição as soluções foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução de NaCl 0,85% (v/v). Em seguida, 200 µL de TSB foram

adicionados às cavidades e as microplacas foram incubadas a 37°C/24h. Posteriormente, realizou-se o plaqueamento de alíquotas de 10 µL das culturas tratadas em TSA pela técnica de microgotas seguido de incubação a 37°C/24h. Ao final, pôde-se observar se tais colônias demonstraram comportamento diferenciado após cultivo sob concentrações subletais de um dado composto majoritário seguido de exposição a outro composto majoritário pela CMB obtida.

3.4 Quantificação e classificação da capacidade de formação de biofilmes

Células de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foram cultivadas, a fim de quantificar e classificar a capacidade de formação de biofilmes por medidas indiretas de densidade óptica a 620 nm. Alíquotas de 50 µL das culturas foram inoculadas nas cavidades das microplacas de forma padronizada em 150 µL de TSB, seguida de incubação a 37°C/48h. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades foram lavadas três vezes com solução de 0,85% de NaCl (m/v) para a remoção das células não aderidas. Para o controle negativo, foram adicionados nas cavidades 200 µL de TSB sem adição de inóculo. Posteriormente, 200 µL de solução de cristal violeta 0,1% (m/v) foram adicionados nas cavidades. Após 10 minutos de exposição a solução foi retirada e as cavidades foram lavadas três vezes com solução NaCl 0,85% (m/v). As microplacas foram secas em temperatura ambiente, e os biofilmes formados desprendidos pela adição de 200 µL de etanol 95% (v/v). Os conteúdos das cavidades foram homogeneizados e transferidos para nova microplaca. A concentração de cristal violeta foi avaliada pela medição de absorbância a 600 nm em leitor de microplaca de poliestireno de 96 poços (Tecan Infinite m200 pro) (adaptado de MERRITT; KADOURI; O'TOOLE, 2011).

Para a determinação da capacidade de formação de biofilme, foi utilizada a seguinte classificação: não-formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn < Doa \leq 2 \times Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \times Docn < Doa \leq 4 \times Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \times Docn < Doa$). Onde Doa é a densidade óptica do biofilme e Docn a densidade óptica do controle de crescimento negativo (STEPANOVIĆ et al., 2000). Os valores finais foram obtidos pelas médias aritméticas das absorbâncias lidas, sendo realizadas 8 replicatas.

3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cinética de consumo de cinamaldeído por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* foi determinada.

O aparelho Shimadzu[®] LC-20AT foi utilizado para as análises de HPLC equipado com o detector de rede de fotodiodo SPD-M20A, forno de coluna utilizado de modelo: CTO-20AC e injetor automático: SIL-220AHT. A temperatura do forno de coluna no momento da injeção foi de 40°C, volume de injeção das amostras de 20 µL, fluxo de amostra a 1,5 mL/min e tempo total de análise de 10 minutos para cada amostra. A fase móvel constituiu-se de Canal A: 45% de acetonitrilo; Canal B: 25% de ácido acético glacial a 0,5% (v/v) e 30% de água ultrapura (Milli-Q). A fase estacionária constituiu-se de uma coluna do tipo C18 com 250 mm de largura e 4,6 mm de diâmetro. Os dados obtidos foram processados com o auxílio do software Shimadzu[®] LabSolutions.

Salmonella Enteritidis e *S. Typhimurium* foram cultivadas em presença de concentração subletal (170 µg/mL) e letal (1000 µg/mL) de cinamaldeído. Alíquotas de 25 µL de culturas padronizadas de *Salmonella* foram adicionadas, em duplicata, a microtubos contendo 500 µL de TSB acrescidos de 0,5% de Tween 80. E incubados a 37°C. Após 0; 15; 30; 60; 120; 180; 240; 360 e 480

minutos de cultivo, microtubos foram adicionados de solução de acetonitrilo (cianeto de metila) purificado na proporção de 1:1 mL de TSB (500 µL) seguido de vigorosa agitação. Dessa forma, obteve-se um total de 1000 µL de cultura inativada quimicamente pela ação da solução de acetonitrilo sobre proteínas formando complexos com cátions metálicos em locais catalíticos de várias enzimas. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 1050 g a 4°C/4 min. O sobrenadante foi filtrado em microfiltros de 13 mm de diâmetro com 0,22 µm de tamanho do poro (Merck), sendo os filtrados depositados em frascos padrão para a análise em equipamento de HPLC e mantidas sob refrigeração a 4°C, até o momento da análise (adaptado de YUAN et al., 1992).

A alíquota de amostra microfiltrada foi submetida a uma etapa de diluição em acetonitrilo para a adequação com a faixa de trabalho (0,03 a 50 mg/L) estabelecida em testes preliminares. As amostras de culturas cultivadas em concentrações subletais (170 mg/L) de cinamaldeído sofreram uma diluição de 1:2, já as submetidas a concentrações letais (1000 mg/L) foram diluídas em 1:10.

Realizou-se a construção de uma curva de calibração para o composto cinamaldeído (93%) utilizando-o como *standard*, ajustado ao comprimento de onda de maior absorbância (290 nm). Dessa forma, pode-se determinar o limite de detecção para as análises de quantificação do composto majoritário presente nas amostras, bem como verificar a correlação da absorbância pela área obtida.

3.6 Análises estatísticas

Verificou-se entre os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* quanto à variância das áreas obtidas por HPLC. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em duas repetições. Os dados foram analisados, utilizando-se o software Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011). As

áreas obtidas foram submetidas à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentrações mínimas bactericidas (CMB) e mínimas bactericidas dos biofilmes (CMBB)

As CMB dos compostos majoritários, cinamaldeído, citral e linalol são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 Concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral sobre células planctônicas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

	CMB (%)		
	Cinamaldeído	Citral	Linalol
<i>S. Enteritidis</i>	0,06	0,25	0,25
<i>S. Typhimurium</i>	0,06	0,25	0,12

O componente cinamaldeído inibiu, totalmente, o crescimento de células planctônicas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em concentrações de 0,06% (v/v). Na mesma avaliação, os compostos citral e linalol obtiveram o mesmo efeito em 0,25% em testes sobre *S. Enteritidis*. Para células planctônicas de *S. Typhimurium* foram necessárias concentrações de 0,25% de citral e 0,12% de linalol para a total eliminação. Cinamaldeído mostrou-se o mais eficiente na inibição e eliminação de células planctônicas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* quando comparado aos outros compostos em estudo.

Testes similares realizados por Huang et al. (2014), utilizando óleo de *Cinnamomum cassia*, contendo elevada quantidade (68,52%) de cinamaldeído e colônias de *Salmonella Typhimurium*, apontaram CMI e CMB de 10 e 20 mg/mL (equivalente a 1 e 2%), respectivamente, sugerindo que o composto cinamaldeído é o responsável pelo efeito bactericida. Os mesmos autores

revelam que a perda da permeabilidade e integridade da membrana celular com consequente extravasamento de conteúdo intracelular pode ser o principal efeito dos mecanismos de ação de óleos essenciais de canela (*Cinnamomum cassia*) sobre *S. aureus* e *E. coli*, que contém o composto trans-cinamaldeído como majoritário. Beraldo et al. (2013) determinaram a CMB de >0,02% e 0,04% utilizando óleos de canela (67,58% de cinamaldeído) e cravo-da-índia (77,58% de eugenol), respectivamente, para *Salmonella* sp. em direta comparação com CMB de hipoclorito de sódio (0,2%), sanitizante de uso comum em indústria de alimentos, comprovando o potencial de utilização de produtos naturais como agentes sanitizantes.

A ação bactericida de fenilpropanoides, como cinamaldeído, e terpenos, como citral e linalol, ainda não é completamente compreendida. Todavia, compreende-se que há ruptura da membrana citoplasmática bacteriana, em razão da natureza lipofílica desses compostos (COWAN, 1999), além de provocar distorção na estrutura física da célula, causando expansão e consequente desestabilidade na membrana, modificando sua permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais e alterando a força próton motora por meio de variações no pH e potencial elétrico e, por fim, vazamento de material celular intracelular como íons, ATP e ácido nucléico (HELANDER et al., 1998; TROMBETTA et al., 2005).

A viabilidade dos compostos majoritários de óleos essenciais como antimicrobianos naturais sobre células planctônicas e sésseis é permitida pelo reconhecimento do efeito bactericida. Assim, torna-se necessário verificar a CMBB, tornando possível, por testes *in vitro*, que os compostos possam também ser eficientes no controle de comunidades complexas formadas por bactérias.

Na tabela 2, encontram-se as CMBB dos componentes majoritários sobre *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Tabela 2 Concentrações mínimas bactericidas dos componentes majoritários cinamaldeído, eugenol e citral sobre biofilmes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

	CMBB (%)		
	Cinamaldeído	Citral	Linalol
<i>S. Enteritidis</i>	0,50	0,50	4,00
<i>S. Typhimurium</i>	0,50	0,25	5,00

Os biofilmes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* sofreram ação de concentrações decrescentes de compostos majoritários cinamaldeído, citral e linalol. O composto linalol foi capaz de eliminar biofilmes de *S. Enteritidis* em concentração de 4,00% (v/v), enquanto que os compostos citral e cinamaldeído promoveram o mesmo efeito em 0,50%. Em biofilmes de *S. Typhimurium* foram necessárias concentrações de 5,00% de linalol, 0,25% de citral e 0,50% de cinamaldeído como CMBB.

Particularmente, o composto citral obteve o melhor desempenho em relação aos demais compostos, principalmente sobre células sésseis de *S. Typhimurium*. Destaca-se a discrepância do efeito obtido pelo composto linalol onde foi observado grau de eficiência 8 vezes menor que cinamaldeído e citral para *S. Enteritidis*, e, sobretudo, em células sésseis de *S. Typhimurium* acerca do composto citral (20 vezes menos eficiente). Os resultados obtidos corroboram com os encontrados por Adukwu, Allen e Phillips (2012) em cepas resistentes de *S. aureus* utilizando óleo de capim-limão de alta pureza para citral (33% de geranial e 47% de neral), demonstrou-se que o composto possui alta atividade antibiofilme em concentrações entre 0,06 a 0,12% (v/v).

Ao passo que os biofilmes são desenvolvidos, as células aderidas se fixam de maneira irreversível até o estágio de maturação e tornam-se mais difíceis de serem removidas por forças mecânicas ou agentes químicos (OLIVEIRA et al., 2010). Assim, é aconselhável o tratamento preventivo contra

biofilmes em ambiente de processamento de alimentos, ao invés da tentativa de remoção mecânica ou química, em decorrência de fatores que tornam sua eliminação dificultada como aderência a superfícies (KELLY et al., 2012; SINDE; CARBALLO, 2000), visto que biofilmes são compreendidos como estruturas de sobrevivência e virulência (SOTO et al., 2006; VUONG et al., 2004).

4.2 Análise de adaptação e adaptação cruzada

O evento de adaptação microbiana pode ocorrer em ambiente industrial com relativa facilidade, em razão da prática habitual de diluição de agentes sanitizantes para fins de maior rendimento econômico.

Os testes realizados, neste trabalho, dispuseram-se em distintas estratégias de cultivo para a verificação do comportamento adaptativo, conforme a introdução do agente estressor em cada etapa de desenvolvimento. A adaptação em estágio planctônico, foi realizada pela adição de $\frac{1}{4}$ da concentração obtida nos testes de CMB de células planctônicas: 0,015% de cinamaldeído para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; 0,06% de citral para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; 0,06% de linalol para *S. Enteritidis* e 0,03% de linalol para *S. Typhimurium*.

Tabela 3 CMB de biofilmes adaptados em estágio planctônico

	CMBB de adaptação em estágio planctônico (%)		
	Cinamaldeído	Citral	Linalol
<i>S. Enteritidis</i>	0,75	1,00	5,00
<i>S. Typhimurium</i>	0,75	0,50	6,00

Adaptação a concentrações subletais de agentes sanitizantes é evento comum em bactérias patogênicas, como ocorrido em fosfato trissódico, nitrito de sódio, e hipoclorito de sódio por colônias de *E. coli* (ALONSO-CALLEJA et al., 2015; CAPITA et al., 2014), ácido peracético, cloro e sais de quaternário de amônio por colônias de *Listeria monocitogenes* (BELESSI et al., 2011) e ácido hipoclorítico em *Salmonella Typhimurium* (MØRETRØ et al., 2012). Beraldo et al. (2013) ressaltam a importância da continuidade de pesquisas com foco na aplicabilidade dos óleos essenciais como princípios ativos para sanitizantes, além de necessidade de aprimoramento do processo de obtenção de óleos essenciais, para que ocorra redução no custo dos mesmos.

Os dados fornecidos pela Tabela 3 demonstram que as CMBB de células adaptadas em estágio planctônico exibem aumento global (de 20 a 100%), quando comparadas as CMBB das células sésseis que não sofreram exposição a concentrações subletais. Mais uma vez o composto citral exerceu maior efeito bactericida em biofilmes de *S. Typhimurium*, desta vez após adaptação em estágio planctônico (0,5%). Já, para os compostos cinamaldeído e linalol foi observado um perfil semelhante a testes anteriores onde houve notável discrepância nas CMBB, pela menor eficiência de linalol. Zhang et al. (2014) atribuíram aos compostos citral e cinamaldeído propriedades antibiofilmes mistos pela redução de elementos autoindutores de sinais de comunicação bacteriana (AI-2) em *S. aureus* e *S. Enteritidis*.

Para os testes de adaptação do biofilme foram utilizadas as concentrações subletais de compostos majoritários em $\frac{1}{4}$ *S. Enteritidis* e $\frac{1}{8}$ para *S. Typhimurium* com base nos resultados obtidos das CMBB dos respectivos compostos para cada sorotipo. Essa diferença entre as concentrações subletais ocorreu, em razão da menor capacidade de formação do biofilme em populações de *S. Typhimurium*. Dessa forma, obteve-se: 0,12% de cinamaldeído para *S. Enteritidis* e 0,06% de cinamaldeído para *S. Typhimurium*; 0,12% de citral para

S. Enteritidis e 0,03% de citral para *S. Typhimurium*; 1,0% de linalol para *S. Enteritidis* e 0,625% de linalol para *S. Typhimurium* (Tabela 4).

Tabela 4 CMB de biofilmes adaptados em estágio sésil

	CMBB de adaptação em estágio sésil (%)		
	Cinamaldeído	Citral	Linalol
<i>S. Enteritidis</i>	0,37	0,25	3,00
<i>S. Typhimurium</i>	0,25	0,25	2,50

Os resultados apontados na Tabela 4 mostram o decréscimo global das CMBB observadas nos ensaios anteriores, além da preservação dos perfis de eficiência já observados, onde cinamaldeído e citral apontam maior eficácia que linalol. Provavelmente, essa queda nas concentrações bactericidas observadas atribui-se ao tempo mais extenso de exposição (12 horas) em comparação ao teste de adaptação em estágio planctônico (20 minutos), juntamente com o fato de tratar-se de uma situação onde a estrutura de biofilmes já se encontrava pré-estabelecida.

Acredita-se que o biofilme instalado oferece menor poder de penetração do agente sanitizante, em decorrência da presença de componentes extracelulares variados que prejudicam sua eficiência. Há a necessidade de questionamento de que o estágio sésil da célula bacteriana talvez não deva proporcionar subsídios para que haja processo de adaptação com melhores condições de sobrevivência para a célula, como síntese de proteínas SOS e alterações em âmbito genético. Por ensaios ultraestruturais e de efeito pós-contato.

Uma comparação com os resultados obtidos entre as CMBB de células adaptadas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em estágio planctônico e sésil, verifica-se que a exposição concentrações subletais de compostos majoritários, por um intervalo relativamente curto de tempo (20 minutos), em estágio

planctônico, promove uma vantagem ambiental para as células, visto o aumento da CMBB, ao passo que a exposição prolongada (12 horas) de concentrações subletais de compostos majoritários sobre biofilmes já estabelecidos, torna-os mais sensíveis a uma nova intervenção do mesmo agente sanitizante. Korenblum et al. (2013), utilizando *Desulfovibrio alaskensis*, testaram concentrações subletais de citral e óleo de capim-limão, sendo 0,17 mg/mL e 0,085 mg/mL as CMB e subletal, respectivamente. A exposição de 10^5 UFC/mL de células por 24 horas reduziu 1log da população de células planctônicas e provocou eliminação de biofilmes cultivados em cupons de vidro e aço corados por propídio iodado, enquanto que o grupo controle exibiu populações de 10^7 UFC/mL.

Testes de adaptação cruzada avaliaram a ação bactericida dos compostos majoritários, após exposição a concentrações subletais de um composto distinto sobre células em estágio planctônico de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. (Tabela 5). Assim, células previamente expostas a concentrações subletais de cinamaldeído foram testadas contra citral e linalol (separadamente); células cultivadas sob estresse subletal de citral foram submetidas a doses de cinamaldeído e linalol; e células previamente expostas a linalol foram testadas contra doses de cinamaldeído e citral. Assim como os testes de adaptação de células planctônicas, foram utilizadas $\frac{1}{4}$ das CMB obtidas nos testes anteriores: 0,015% de cinamaldeído para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; 0,06% de citral para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; 0,06% de linalol para *S. Enteritidis* e 0,03% de linalol para *S. Typhimurium*.

Tabela 5 Concentração mínima bactericida de células de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* submetidas a adaptação cruzada

Fator estressor	CMB (%)					
	Cinamaldeído		Citral		Linalol	
	Citral	Linalol	Cinamal.	Linalol	Cinamal.	Citral
<i>S. Enteritidis</i>	1,00	6,00	0,50	7,00	0,25	6,00
<i>S. Typhimurium</i>	0,50	6,00	0,25	6,00	0,50	6,00

Cinamal. - Cinamaldeído.

De forma geral, o composto cinamaldeído manteve o mesmo padrão eficiência quando comparado a testes anteriores, exibindo casos de aumento de eficiência após exposição a doses subletais de citral (em *S. Typhimurium*) e linalol (em *S. Enteritidis*). O composto linalol necessitou de concentrações elevadas (6,0%) para eliminar sorotipos de *Salmonella* adaptadas a doses subletais de cinamaldeído e citral, demonstrando alto potencial de resistência adaptativa bacteriana.

Estratégias para a célula contrapor-se aos efeitos de antimicrobianos incluem a formação de biofilmes, inativação do elemento estressor antes que alcance o sítio alvo por enzimas ou por bombas de efluxo, mudanças na permeabilidade da superfície celular ou do sítio alvo, e aquisição de vias metabólicas alternativas às inibidas pelo agente (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS, 2006).

Alonso-Calleja et al. (2015) experimentaram fatores de adaptabilidade relacionados a fisiologia celular, como bombas de efluxo e mudanças na hidrofobicidade da superfície celular de células de *E. coli* submetidas a adaptação-cruzada de agentes sanitizantes comuns na indústria de alimentos e considerou que medidas cautelares devem ser tomadas ao utilizar concentrações subletais, especialmente em vista do conceito de barreiras, que defende a

hipótese de que diversos fatores inibitórios podem ser altamente eficientes quando utilizados em conjunto.

Bombas de efluxo, que são um importante mecanismo de resistência, são proteínas de transporte que removem elementos antimicrobianos que penetram a célula até níveis inofensivos (ALANIS, 2009). Alonso-Calleja et al. (2015) defendem que bombas de efluxo podem contribuir na adaptação de *E. coli* frente a biocidas, pois células que não sofreram adaptação cruzada mostraram diferenças mínimas na cinética de crescimento tanto em presença quanto na ausência do inibidor de efluxo e fosforilação oxidativa CCCP (Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona), enquanto que o efeito de CCCP em células que sofreram adaptação cruzada foi elevado.

Um fato excepcional foi observado em células de ambos os sorotipos quando expostos a doses subletais de linalol e, posteriormente, ao citral. O composto majoritário citral, que havia sido qualificado de eficácia equivalente ao cinamaldeído em diversos casos, revelou vulnerabilidade, em razão da necessidade de elevadas concentrações (6,0%) para a eliminação de biofilmes de sorotipos de *Salmonella* após testes de adaptação cruzada com o composto linalol.

Acredita-se que a prévia exposição celular ao linalol possa ter promovido alguma alteração no mecanismo de resistência bacteriana a terpenos que culminou na ocorrência de resistência ao aumento da tolerância a ele. Essa evidenciação sugere que sistemas alternados de aplicação de compostos majoritários como agentes sanitizantes em ambiente industrial não seja uma alternativa eficaz no controle e segurança microbiológica, sem que os mecanismos de resistência microbiana relacionados sejam intimamente elucidados.

4.3 Análise de medidas espectrofotométricas e classificações da capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de formação e classificação dos biofilmes foram avaliadas para os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Tabela 6 Medidas espectrofotométricas de formação de biofilme

Formação de biofilme em microplaca			
	Doa	Docn	Class.
<i>S. Enteritidis</i>	0,29805	0,05144	Forte.
<i>S. Typhimurium</i>	0,14591	0,05246	Mod.

Doa - Densidade óptica do biofilme; Docn - Densidade óptica do controle negativo; Class. - Classificação; Forte - Fortemente; Mod. - Moderadamente.

Segundo a classificação adotada (STEPANOVIĆ et al., 2000), os resultados apresentados na Tabela 6 apontam que cepas de *S. Enteritidis* são fortes formadoras de biofilme, enquanto que *S. Typhimurium* apresentam moderada capacidade de formação de biofilme em ausência de exposição à estresse subletal de compostos majoritários.

Tabela 7 Medidas espectrofotométricas de adaptação em estágio planctônico

Adaptação em estágio planctônico (48h em ¼ da CMB)								
	Cinamaldeído		Citral		Class.	Linalol		Class.
	Doa	Docn	Doa	Docn		Doa	Docn	
<i>S. E.</i>	0,5537	0,0503	0,4082	0,0532	Forte	0,4006	0,0509	Forte
<i>S. T.</i>	0,1825	0,0564	0,2058	0,0585	Mod.	0,3157	0,0571	Forte

S. E. - *Salmonella* Enteritidis; *S. T.* - *Salmonella* Typhimurium; Doa - Densidade óptica do biofilme; Docn - Densidade óptica do controle negativo; Class. - Classificação; Forte - Fortemente formadora de biofilme; Mod. - Moderadamente formadora de biofilme.

Na Tabela 7, apresentam-se os dados obtidos para células adaptadas em estágio planctônico, onde há considerável aumento nas médias das densidades ópticas mensuradas quando comparadas às isentas de exposição a estresse subletal. Testes realizados com *S. Typhimurium* sob estresse subletal de linalol sugerem valores acima de quatro vezes a densidade óptica do controle negativo para o mesmo teste, sendo classificado como fortemente formadora de biofilme. Tais dados comprovam a intensificação da resistência a compostos majoritários em biofilmes de sorotipos de *Salmonella enterica* provocada pela adaptação em estágio planctônico.

Espina et al. (2015) sugerem a hipótese de que compostos majoritários afetam a viabilidade das células ainda em estágio planctônico, o que pode alterar o ciclo de formação do biofilme, fato que explicaria a diferença de massa celular observada na presença e ausência de compostos majoritários. Seus ensaios com isolados clínicos de *S. aureus* submetidos a doses subletais de carvacrol, citral e limoneno (separadamente) por 8 horas, indicaram decréscimo de 1,5log, enquanto que os controles negativos para compostos majoritários aumentaram de 10^7 para 10^8 . Dessa forma, Espina et al afirmam que o tempo de incubação deve ser considerado como fator importante para efeitos de comparação entre cepas bacterianas onde, preferencialmente, deve-se medir mais de um intervalo de tempo de incubação.

Tabela 8 Medidas espectrofotométricas de adaptação em estágio sésil

Adaptação em estágio sésil (12h em ¼ da CMBB para <i>S. Enteritidis</i> e ⅛ para <i>S. Typhimurium</i>)							
	Cinamaldeído		Citral		Linalol		Class.
	Doa	Docn	Doa	Docn	Doa	Docn	
<i>S. E.</i>	0,0752	0,0591	0,0688	0,0585	0,059	0,0553	Fraca
<i>S. T.</i>	0,0602	0,0528	0,0585	0,0527	0,0646	0,0528	Fraca

S. E. - *Salmonella* Enteritidis; *S. T.* - *Salmonella* Typhimurium; Doa - Densidade óptica do biofilme; Docn - Densidade óptica do controle negativo; Class. - Classificação; Fraca - Fracamente formadora de biofilme.

As medições realizadas após adaptação em estágio sésil estão dispostas na Tabela 8, onde registra-se marcante decréscimo nas médias das densidades ópticas quando comparadas as observadas em células livres de adaptação subletal. As médias obtidas de biofilmes formados e expostos por 12 horas em concentrações subletais de compostos majoritários foram classificadas como fracamente formadoras de biofilmes para ¼ da CMBB em *S. Enteritidis* e ⅛ para *S. Typhimurium*.

Tabela 9 Medidas espectrofotométricas de adaptação em estágio sésil

Adaptação em estágio sésil (12h em ¼ da CMBB)							
	Cinamaldeído		Citral		Linalol		Class.
	Doa	Docn	Doa	Docn	Doa	Docn	
<i>S. T.</i>	0,0508	0,0521	0,0485	0,0491	0,0536	0,0547	N/For.

S. T. - *Salmonella* Typhimurium; Doa - Densidade óptica do biofilme; Docn - Densidade óptica do controle negativo; Class. - Classificação; N/For. - Não formadora de biofilme.

Na Tabela 9, relatam-se as medições realizadas em *S. Typhimurium*, utilizando ¼ da CMBB obtida anteriormente onde destaca-se a ausência de formação de biofilmes, por todas as médias das densidades ópticas medidas serem inferiores às obtidas em controle negativo. Nota-se que a cepa de *S.*

Typhimurium utilizada, neste estudo, é suscetível ao tratamento de 12 horas sob $\frac{1}{4}$ da CMBB obtida de compostos majoritários cinamaldeído, citral e linalol. Dessa forma, supõe-se que concentrações subletais de compostos majoritários possam provocar diferentes consequências em biofilmes bacterianos de sorotipos *Salmonella enterica*, de acordo com a quantidade aplicada, tempo de exposição e estado de adesão celular a superfícies.

4.4 Análise da cinética do consumo de cinamaldeído por HPLC

Essa análise buscou determinar a cinética de consumo do composto majoritário cinamaldeído pelas cepas de *Salmonella enterica* sorotipos Enteritidis e Typhimurium ao decorrer do tempo.

Para a certificação da precisão dos dados obtidos pelo aparelho de HPLC, foi elaborada uma curva de calibração para o composto majoritário cinamaldeído, utilizando-o como *standard* a 93% (v/v) de pureza (figura 1). Considera-se o valor de r^2 obtido como de alta precisão para as análises cromatográficas. Estabeleceu-se por 0,03 a 50 mg/L como a margem de trabalho, sendo o intervalo de concentrações que a performance do aparelho de HPLC era confiável para a leitura de resultados.

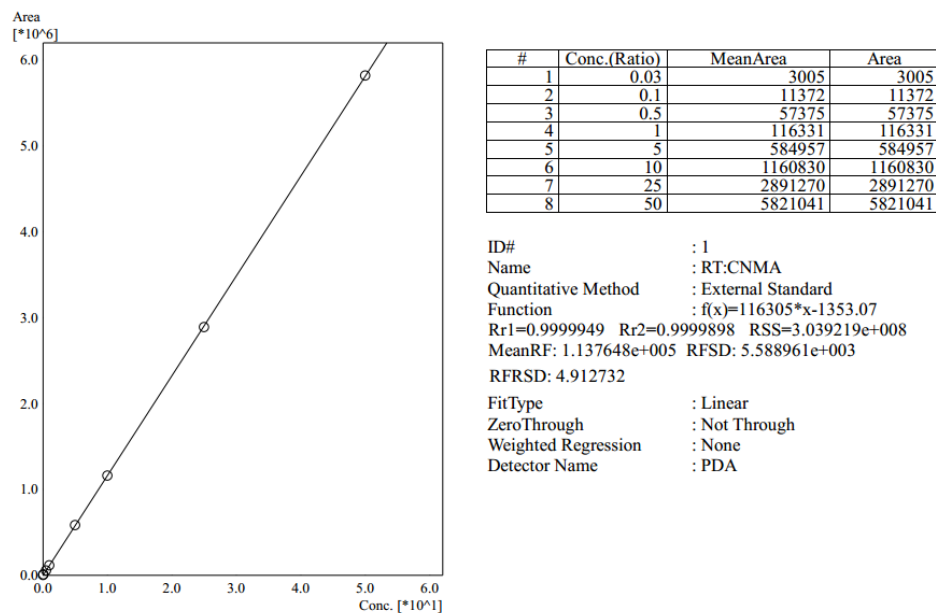


Figura 1 Curva de calibração para o composto cinamaldeído

Testes preliminares permitiram identificar o comprimento de onda de maior absorção do composto cinamaldeído (figura 2) e o tempo de retenção do composto majoritário cinamaldeído em solução de 10 mg/L (ppm) em acetonitrilo (figura 3). O comprimento de onda apontado como o de maior absorção em mAU do composto cinamaldeído, e assim, adotado para as análises posteriores, foi de 290nm. O tempo de retenção identificado como padrão para o composto cinamaldeído foi de 5,832 segundos, em razão do *peak* de maior elevação em 290 nm.

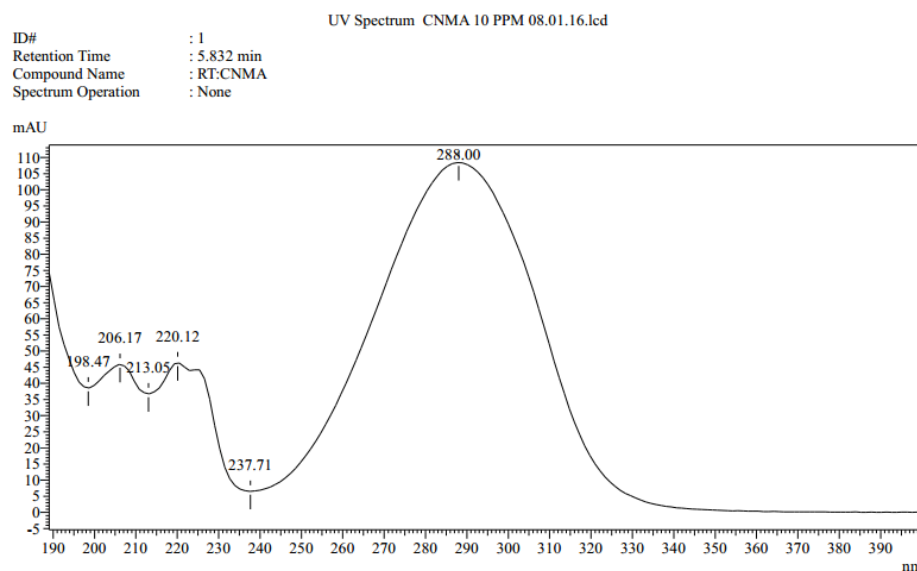


Figura 2 Cromatograma por HPLC que revela o *peak* de comprimento de onda (nm) de maior absorção UV

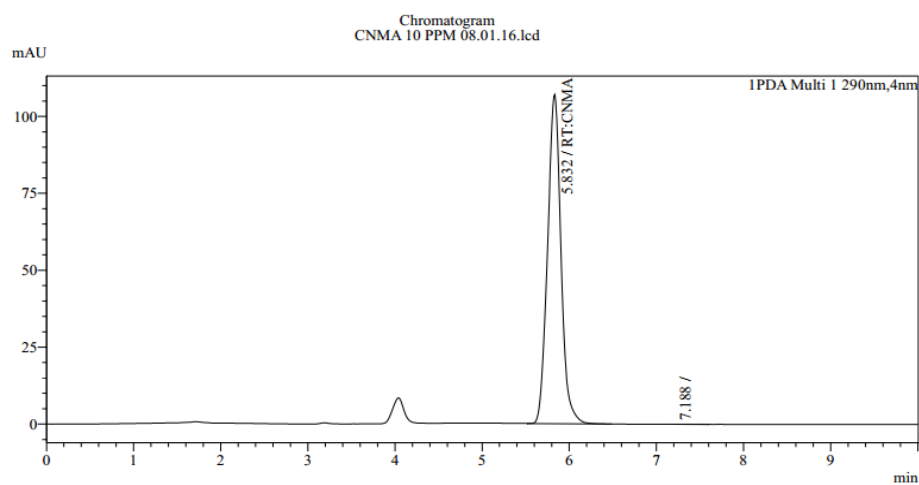


Figura 3 Cromatograma por HPLC que exhibe o tempo de retenção do composto cinamaldeído

Para alcançar a garantia de que não houvesse interferência entre o *peak* de cinamaldeído com outros *peaks* de substâncias presentes nas amostras, foram

realizadas análises preliminares com soluções de acetonitrilo (substância responsável pelo rompimento das células bacterianas) e soluções de TSB acrescidas de 0,5% de Tween 80 e isenta Tween 80 (responsável pelo fornecimento de nutrientes necessários para o crescimento populacional bacteriano e o favorecimento da interação entre o composto majoritário e as células bacterianas).

Conforme a figura 4, o cromatograma obtido apontou plena distinção dos *peaks* de cinamaldeído com base no tempo de retenção previamente identificado (5,832 segundos). Essa etapa assegurou que nenhum componente interferiu na identificação de *peaks* do composto cinamaldeído pois permaneceram suficientemente distantes da faixa de detecção de interesse.

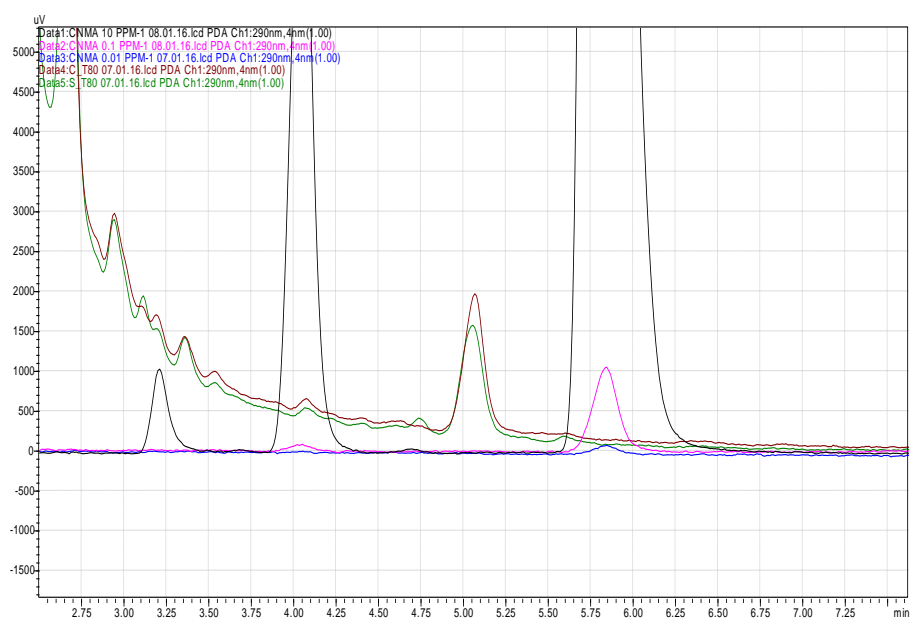


Figura 4 Cromatograma por HPLC que inclui os *peaks* de 10 mg/L (preto); 0,1 mg/L (rosa) e 0,01 mg/L (azul) de cinamaldeído em solução de acetonitrilo e solução de TSB com 0,5% de Tween 80 (marrom) e sem Tween 80 (verde)

Tendo em vista que durante o processo de rompimento celular por adição de acetonitrilo na proporção de 1:2, resultou-se nas diluições de 1:4 e 1:20 para as concentrações subletais e letais, respectivamente.

Os cromatogramas gerados a partir das análises por HPLC permitiram idealizar a cinética do consumo de cinamaldeído de sorotipos de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (apêndice) e os dados numéricos tabulados na Tabela 10.

Tabela 10 Leituras obtidas pelos cromatogramas para cinética de consumo de cinamaldeído

Tempo (min)	Concentração (mg/L)					
	170 mg/L		Desvio Padrão	1000 mg/L		Desvio Padrão
	S. E.	S. T.		S. E.	S. T.	
0	170,10	170,28	0,13	986,65	976,02	7,52
10	164,08	164,40	0,23	937,47	956,02	13,12
30	160,15	161,08	0,66	922,24	940,53	12,93
60	154,41	159,04	3,27	898,40	903,46	3,58
120	148,58	148,70	0,08	883,46	895,53	8,53
180	133,24	133,78	0,38	869,18	864,41	3,37
240	102,00	122,54	14,52	840,09	852,94	9,09
360	7,24	15,43	5,79	794,46	787,61	4,84
480	4,76	5,22	0,33	712,23	687,52	17,47

S. E. - *Salmonella* Enteritidis; S. T. - *Salmonella* Typhimurium; Min: minutos.

Em doses subletais, as amostras bacterianas reduziram a quantidade de cinamaldeído a porções ínfimas, quando comparadas às iniciais, que indicam a inativação dos sítios ativos de ação bactericida do composto majoritário. Observa-se a taxa de 94,6% de decréscimo da quantidade de cinamaldeído (133,24 a 7,24 mg/L em *S. Enteritidis*) entre o intervalo de 240 a 360 minutos,

que coincide com o intervalo de maior crescimento populacional das cepas bacterianas, conforme os resultados obtidos da padronização dos inóculos por curva de crescimento. Tal fato manifesta a correlação do aumento populacional bacteriano com o aumento do consumo de cinamaldeído por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Sob o efeito de doses letais de cinamaldeído, as cepas bacterianas manifestaram perfis de inibição de consumo do composto cinamaldeído. Nota-se gradual decaimento da quantidade de cinamaldeído ao decorrer do tempo até em 70% do valor inicial (976,02 a 687,52 mg/L em *S. Typhimurium*), todavia, essa diminuição é atribuída à degradação espontânea das moléculas do composto majoritário, em razão das condições de cultivo. Essa hipótese é reforçada pela ausência de redução brusca proveniente do aumento populacional bacteriano observado em condições subletais, de modo que a população inicial foi eliminada em fases precoces (até 10 minutos) de cultivo (figura 5).

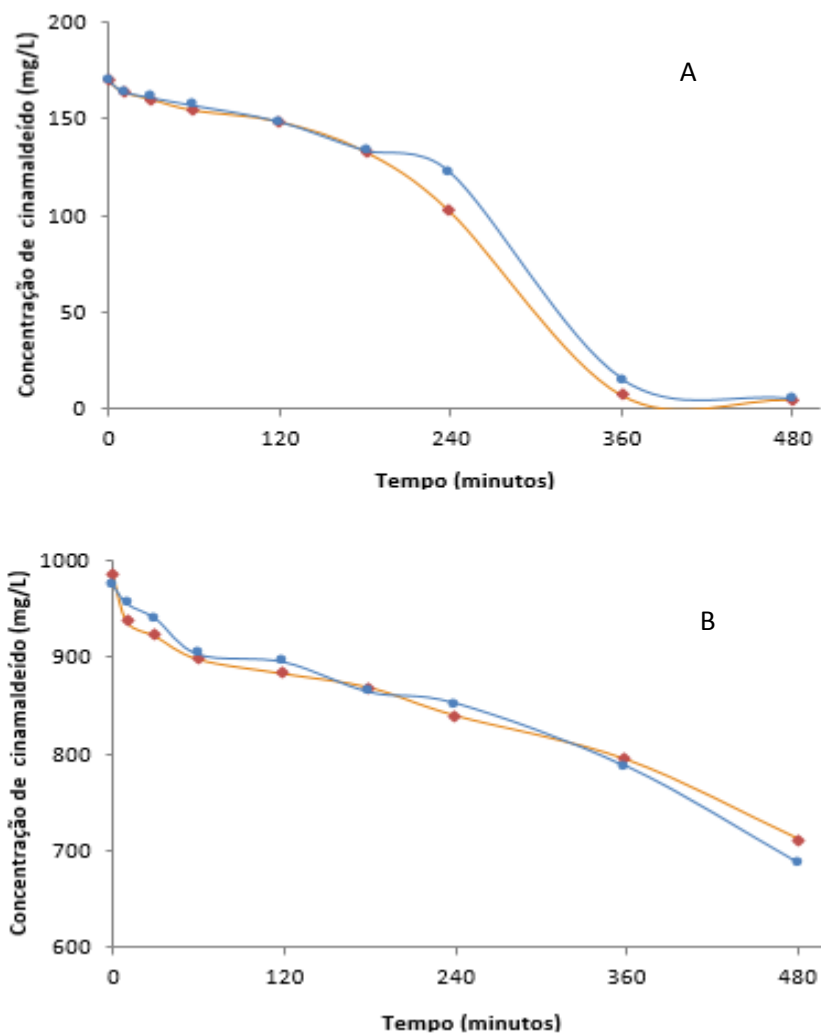


Figura 5 Cinética de consumo de cinamaldeído em doses subletais (A) e letais (B) por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Concentrações subletais (170 mg/L) e concentrações letais (1000 mg/L). Os sorotipos *Salmonella* Enteritidis são representados por linhas e esferas azuis, enquanto que *Salmonella* Typhimurium por linhas e esferas alaranjadas

As médias das áreas obtidas pelos sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* provaram-se distintos estatisticamente ($p < 0,05\%$) nos testes de HPLC em concentrações subletais, o que sugere comportamentos metabólicos diferentes frente à mesma concentração de cinamaldeído. Contudo, em testes utilizando concentrações letais, não foi observada discrepância estatística ($p < 0,05\%$) entre os sorotipos, o que suplanta a hipótese de que o composto cinamaldeído exerceu o efeito bactericida nas etapas iniciais de cultivo.

Logo, é possível constatar que a taxa de consumo de cinamaldeído por *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* é dependente da quantidade de composto majoritário presente no ambiente de colonização. Dessa forma, acentua-se a responsabilidade de administração de doses de agentes sanitizantes compatíveis com a eliminação de sorotipos bacterianos em ambiente industrial, a fim de preservar inocuidade de superfícies e equipamentos utilizados em práticas de produção alimentícia.

5 CONCLUSÃO

Dentre os compostos majoritários testados, cinamaldeído foi eficiente contra células planctônicas e sésseis de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* e a eficácia do composto citral foi afetada negativamente pela adaptação cruzada a concentrações subletais de linalol. Biofilmes de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* se fortaleceram após adaptação em estágio planctônico e se enfraquecem, após exposição a concentrações subletais em estágio sésil.

A cinética de consumo de cinamaldeído foi dependente da concentração em que o microrganismo foi exposto, ressaltando a necessidade de medidas seguras para o uso de compostos majoritários de óleos essenciais para a sanitização de superfícies e equipamentos de indústrias de alimentos.

REFERÊNCIAS

ADUKWU, E. C.; ALLEN, S. C. H.; PHILLIPS, C. A. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 113, n. 5, p. 1217–1227, Ago. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 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. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 5 set. 1988.

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? **Archives of Medical Research**, United States, v. 36, n. 6, p. 697-705, June 2009.

ALMEIDA, I. et al. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. **Parasitology Research**, Germany, v. 101, n. 2, p. 443-452, Mar. 2007.

ALONSO-CALLEJA, C. et al. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. **Food Control**, Guildford, v. 56, p. 86-94, Oct. 2015.

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.

ANDREATTI FILHO, R. L. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 90-101, 2001.

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.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. United States: Wiley-Blackwell, 2010. p. 231-265.

BELAICHE, T.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sciences des Aliments**, France, v. 15, p. 571-578, 1995.

BELESSI, C. E. et al. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 145, n. 1, p. 46-52, Mar. 2011.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436-440, out./dez. 2013.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. (Ed.). **Doença das aves**. São Paulo: FACTA, 2009. p. 435-454.

BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. New York: Springer-Verlag, 2008. 276 p.

BORGES, A. et al. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microbial Drug Resistance**, Washington, v. 19, n. 4, p. 256-265, July 2013.

BOS, R. et al. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, United Kingdom, v. 189, n. 2, p. 311-315, Aug. 2000.

BRAOUDAKI, M.; HILTON, A. C. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 31-37, Jan. 2005.

BURMØLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 324-336, Aug. 2010.

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.

CAPITA, R. et al. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 80, n. 4, p. 1268–1280, Feb. 2014.

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

CARVALHO FILHO, J. L. S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 24-30, jan./mar. 2006.

CASTRO, L. O.; RAMOS, R. L. D. Principais Gramíneas Produtoras de Óleos Essenciais. **Boletim FEPAGRO**, Porto Alegre, n. 11, p. 5-7, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Multistate outbreak of *Salmonella* braenderup infections linked to nut butter manufactured by inspired natural foods**. Atlanta: CDC, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-14/index.html>>. Acesso: 01 mar. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National *Salmonella* surveillance overview**. Atlanta: US Department of Health and Human Services, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vital signs: incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food. Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, n. 15, p. 328-332, 2014.

CEVALLOS-CEVALLOS, J. M. et al. Metabolomic analysis in food science: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 11-12, p. 557-566, Dec. 2009.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, United Kingdom, v. 51, n. 4, p. 271-276, June 2003.

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

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

CHEMINAY, C.; CHAKRAVORTTY, D.; HENSEL, M. Role of Neutrophils in Murine Salmonellosis. **Infection and Immunity**, United Kingdom, v. 72, n. 1, p. 468-477, Jan. 2004.

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 29, p. 4192-4199, Oct. 2007.

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**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, June 2008.

CLARK, M. A.; JEPSON, M. A. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. **International Journal of Medical Microbiology**, Germany, v. 293, n. 1, p. 17-39, Apr. 2003.

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

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, United States, v. 12, n. 4, p. 564–582, Oct. 1999.

DAVIDSON, P. M.; HARRISON, M. A. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. **Food Technology**, Chicago, v. 56, n. 11, p. 69-78, Nov. 2002.

DERLON, N. et al. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. **Water Research**, United Kingdom, v. 42, n. 8-9, p. 2102-2110, Apr. 2008.

DI PASQUA, R. D. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, Germany, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, Mar. 2010.

EL FATTAH, M. A. et al. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofia Journal of Agricultural Research**, Egypt, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytochemistry**, Germany, v. 6, n. 2, p. 107-113, May 1999.

ERILL, I.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. **FEMS Microbiology Reviews**, United Kingdom, v. 31, n. 6, p. 637-656, Nov. 2007.

ESPINA, L. et al. Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, Switzerland, v. 20, n. 6, p. 11357-11372, June 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, dez. 2011.

FIGUEIREDO, R. O.; DELACHIAVE, M. E. A.; MING, L. C. Effect of growth regulators in citral content in lemongrass in different seasons. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v. 569, n. 22, p. 47-50, Nov. 2002.

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

FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, United Kingdom, v. 16, n. 5, p. 580-589, Oct. 2013.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: _____. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Manole, 2008. p. 277-356.

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.

GROSSMAN, L. **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde**. São Paulo: Optonline, 2005. 300 p.

GUIMARÃES, L. G. de L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, Sept. 1998.

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

HUANG, D. F. et al. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria. **Microbiology**, United Kingdom, v. 83, n. 4, p. 357-365, July 2014.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, Switzerland, v. 3, p. 1-24, Jan. 2012.

IJIMA, Y. et al. Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 448, n. 1-2, p. 141-149, Apr. 2006.

INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGISTS. Antimicrobial resistance: implications for the food system. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, United States, v. 5, n. 3, p. 71-137, July 2006.

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

JEWETT, M. C.; HOFMANN, G.; NIELSEN, J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 17, n. 2, p. 191-197, Apr. 2006.

JORGE, A. O. C. As bactérias. In: _____. **Microbiologia e imunologia oral**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 352.

KELLY, D. et al. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and reduction in established biofilm density using a combination of phage K and modified derivatives. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 54, n. 4, p. 286–291, Apr. 2012.

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

KOKETSU, M. et al. The bark and leaf essential oils of cinnamon (*Cinnamomum verum* Presl) grown at Paraná, Brazil. **Ciência & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, set./dez. 1997.

KORENBLUM, E. et al. Antimicrobial action and anti-corrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. **AMB Express**, Germany, v. 33, n. 1, p. 44, Aug. 2013.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 9-15, jan./jun. 2010.

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.

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.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LANDAU, E.; SHAPIRA, R. Effects of subinhibitory concentrations of menthol on adaptation, morphological, and gene expression changes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 78, n. 15, p. 5361–5367, Aug. 2012.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, United Kingdom, v. 27, n. 1, p.13-39, Jan. 2012.

LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance: a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, United Kingdom, v. 51, n. 4, p. 283-290, June 2003.

LEVIN, B. R.; ROZEN, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 7, p. 556–562, July 2006.

LIU, Y. et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable-number tandem repeats. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 41, n. 9, p. 4388-4394, Sept. 2003.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, United States, v. 59, p. 415-428, 2008.
MANSFELD, F. The interaction of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, New York, v. 52, n. 27, p. 7670-7680, Oct. 2007.

MARSHAL, K. C.; BLAINEY, B. L. Role of bacterial adhesion in biofilm formation and biocorrosion. In: FLEMMING, H. C.; GEESEY, G. G. (Ed.). **Biofouling and biocorrosion in industrial water systems**. Heidelberg: Springer, 1990. p. 29-45.

MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, United Kingdom, v. 13, n. 5, p. 289–294, Sep./Oct. 1998.

MCGHIE, T. K.; ROWAN, D. D. Metabolomics for measuring phytochemicals, and assessing human and animal responses to phytochemicals, in food science. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 1, p. 147-158, Jan. 2012.

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

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. Growing and analyzing static biofilms. **Current Protocols in Microbiology**, New York, v. 22, Aug.

2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568995/>>. Acesso em: 14 mar. 2015.

MONACK, D. M. *Salmonella* persistence and transmission strategies. **Current Opinion in Microbiology**, United Kingdom, v. 15, n. 1, p. 100-107, Feb. 2012.

MØRETRØ, T. et al. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, United Kingdom, v. 45, n. 2, p. 532-544, Mar. 2012.

MOZZI, F. et al. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. **Food Research International**, Barking, v. 54, n. 1, p. 1152-1161, Nov. 2013.

MÜRMAN, L. et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 529-534, jul./set. 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Wayne: NCCLS, 2003.

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

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent, signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 28, n. 3, p. 449-461, Apr. 1998.

OLIVEIRA, M. M. M. de. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*** enteropatogênica. 2011. 138 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

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

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

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

PEREIRA, A. de A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. 2006. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

PEREIRA, A. de A. **Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp.** 2014. 94 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

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.

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

PRATES, H. T. et al. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 193-197, abr. 1998.

PRIETO, A. I.; RAMOS-MORALES, F.; CASADESÚS, J. Repair of DNA damage induced by bile salts in *Salmonella enterica*. **Genetics**, United States, v. 174, n. 2, p. 575-584, Oct. 2006.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, n. 5, p. 750–763, Sept. 2003.

SÁNCHEZ-VARGAS, F. M.; ABU-EL-HAIJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. *Salmonella* infections: an update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Disease**, United States, v. 9, n. 6, p. 263-277, Nov. 2011.

SANDER, J. E. et al. Investigation of Resistance of Bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Diseases**, Washington, v. 46, n. 4, p. 997-1000, Oct. 2002.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários. In: SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. p. 467-495.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 642 p.

SCHNEIDER, R. P. Biofilmes microbianos. **Microbiologia in Foco**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 4-12, out./dez. 2007.

SESSOU, P.; FAROUGOU, S.; SOHOUNHLOUÉ, D. Major component and potential applications of plant essentials oils as natural food preservatives: a short review research results. **International of Journal Biosciences**, Bangladesh, v. 2, n. 8, p. 45-57, Aug. 2012.

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

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, set./out. 2008.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Mar. 1994.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, maio/ago. 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMOES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004. p. 467-495.

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

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

SOTO, S. M. et al. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, United Kingdom, v. 12, n. 10, p. 1034-1036, Oct. 2006.

STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, United Kingdom, v. 45, n. 2, p. 502-531, Mar. 2012.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, United Kingdom, v. 40, n. 2, p. 175-179, Apr. 2000.

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

SUGAWARA, Y. et al. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. **Analytica Chimica Acta**, Netherlands, v. 365, n. 1-3, p. 293-299, June 1998.

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

TODD, E. et al. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. **Journal of Food Protection**, United States, v. 71, n. 1, p. 202–219, Jan. 2009.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, June 2005.

TUNON, G. I. L. et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 5, n. 52, p. 4-6, abr. 2008.

UNLU, M. et al. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Food and Chemical Toxicology**, United Kingdom, v. 48, n. 11, p. 3274-3280, Nov. 2010.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Bacterial SOS response: a food safety perspective. **Current opinion in Biotechnology**, United Kingdom, v. 22, n. 2, p. 136-142, Apr. 2011.

VENÂNCIO, A. M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos)**. 2006. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2006.

VUONG, C. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 279, n. 52, p. 54881–54886, Dec. 2004.

WALTER, M. et al. Detachment characteristics of a mixed culture biofilm using particle size analysis. **Chemical Engineering Journal**, Netherlands, v. 228, n. 15, p. 1140-1147, July 2013.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, May 2000.

YUAN, J. et al. Quantitation of cinnamaldehyde and cinnamic acid in blood by HPLC. **Journal of Analytical Toxicology**, United States, v. 16, n. 6, p. 359-362, Nov./Dec. 1992.

ZACHARY, J. F. Mecanismo das infecções microbianas. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Ed.). **Bases da patologia em veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 147-241.

ZANCAN, F. T. **Pesquisa de *Salmonella* em caixas de transporte de pintos de um dia de idade**. 1998. 34 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1998.

ZHANG, H. et al. Inhibitory effects of citral, cinnamaldehyde, and tea polyphenols on mixed biofilm formation by foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 77, n. 6, p. 927-933, Jun. 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cromatogramas obtidos por HPLC

