

**AÇÃO BACTERICIDA DE DETERGENTE-
SANIFICANTE À BASE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS SOBRE BIOFILME DE
*Aeromonas hydrophila***

ALESSANDRA FARIAS MILLEZI

2009

ALESSANDRA FARIAS MILLEZI

**AÇÃO BACTERICIDA DE DETERGENTE-
SANIFICANTE À BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE BIOFILME DE *Aeromonas hydrophila***

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

Orientadora

Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Millezi, Alessandra Farias.

Ação bactericida de detergente-sanificante à base de óleos essenciais sobre biofilme de *Aeromonas hydrophila* / Alessandra Farias Milezzi. – Lavras : UFLA, 2009.

69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. *Aeromonas hydrophila*. 2. Biofilme. 3. Óleos essenciais. 4. Aço inoxidável. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

ALESSANDRA FARIAS MILLEZI

**AÇÃO BACTERICIDA DE DETERGENTE-
SANIFICANTE À BASE DE ÓLEOS ESSENCIAIS
SOBRE BIOFILME DE *Aeromonas hydrophila***

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

APROVADA em 12 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

OFEREÇO

Ao meu pai, Tílio, pela confiança, amor e apoio, ainda que longe.

A minha mãe, Anna, pelo exemplo de perseverança e garra, sempre me aconselhando a correr atrás dos meus objetivos e ser feliz.

DEDICO

A Deus, pelos obstáculos colocados em meu caminho e pela força que me deu para que não desistisse e conseguisse transpassá-los.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos momentos de dificuldade sempre me amparou, me dando forças para continuar e seguir minha caminhada.

Ao meu maior alicerce, minha família, meus pais Tílio e Anna, que, mesmo distantes, sempre estiveram presentes nos momentos mais difíceis, por todo o incentivo, carinho, paciência e amor.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de cursar a pós-graduação.

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

À Dra. Maria das Graças Cardoso, pela coorientação, ensinamentos e disponibilização do Laboratório para a extração dos óleos essenciais.

Ao meu primo Rafael e minha irmã Andressa, que sempre confiaram em mim, pela força, apesar da distância.

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

À amiga Perla de Leon, pela amizade, pelo incentivo, pelas palavras nos momentos difíceis, que me transmitiram a segurança necessária para enfrentar essa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Suzana, Victor, Thalles, Rodrigo, Aline, Mariana, Fabiana e Carolina.

Em especial, a Danila, Simone, Dieyckson, Maíra e Danilo, que rapidamente se tornaram mais que colegas, mas verdadeiros amigos.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Daiani, Júlia e Emerson, pela amizade, confiança e companheirismo nas disciplinas.

À Magda, que sempre se mostrou prestativa, pela atenção e paciência.

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

A todos do Laboratório de Química Orgânica, que ajudaram na extração dos óleos essenciais, em especial a Milene e ao Luiz Gustavo, que sempre se mostraram prestativos.

Aos amigos, citados não por ordem de importância, mas por ordem de entrada na minha vida: Emanuella, Charles, Viviane, Euziclei, Adriene, Joyce, Sandra, Victor, Valquíria, Jessé, Luana, Mayara, Juninho, Deisyane, Carina, Emanuelle e Tiago, pela companhia, descontração, humor e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos.

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Adesão microbiana e formação de biofilme	4
2.2 Fatores que influenciam a adesão microbiana	7
2.3 Superfícies envolvidas	9
2.4 Microrganismos envolvidos na formação de biofilme	10
2.4.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	12
2.5 Biofilmes na indústria	13
2.6 Higienização	15
2.6.1 Detergentes alcalinos	16
2.6.2 Sanificante	16
2.7 Óleos Essenciais: aspectos gerais	17
2.7.1 Espécie <i>Cymbopogon citratus</i>	22
2.7.1.1 Óleo Essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	24
2.7.2 Espécie <i>Thymus vulgaris</i>	25
2.7.2.1 Óleo Essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Local e condução do experimento	28
3.2 Microrganismo utilizado e padronização do inóculo	28
3.3 Óleos essenciais	29
3.3.1 Material vegetal	29

3.3.2 Extração dos óleos essenciais	29
3.3.3 Determinação do rendimento dos óleos essenciais	30
3.3.4 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais	30
3.3.5 Determinação da mínima concentração inibitória dos óleos essenciais...	31
3.4 Biofilme	31
3.4.1 Higienização dos cupons	31
3.4.2 Adesão das células bacterianas em superfície de aço inoxidável	32
3.4.2.1 Enumeração das células bacterianas aderidas.....	32
3.4.3 Tratamento dos cupons de aço inoxidável com óleos essenciais adicionados em detergente alcalino	33
3.5 Análise estatística	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Óleos essenciais	36
4.1.1 Rendimento	36
4.1.2 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais	37
4.1.2.1 <i>Cymbopogon citratus</i>	37
4.1.2.2 <i>Thymus vulgaris</i>	38
4.1.3. Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais ...	39
4.2 Biofilme	44
4.2.1 Adesão das células bacterianas em superfície de aço inoxidável	44
4.2.3 Tratamento dos cupons de aço inoxidável com óleos essenciais adicionados em detergente alcalino	46
5 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Rendimento dos óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Thymus vulgaris</i> em Base Livre de Umidade (BLU)	36
TABELA 2	Compostos majoritários de <i>Cymbopogon citratus</i> obtidos através de cromatografia gasosa.....	38
TABELA 3	Compostos majoritários de <i>Thymus vulgaris</i> obtidos através de cromatografia gasosa.....	39
TABELA 4	Valores médios de redução de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 observados após tratamentos com solução detergente sanificante ...	49
TABELA 5	Percentagem de UFC/cm ² de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 observados após tratamento de cupons de aço inoxidável contendo biofilme com soluções detergentes-sanificantes e detergentes a temperaturas de 25°C e 40°C	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo de desenvolvimento de um biofilme.....	5
FIGURA 2	Eletromicrografia de varredura de <i>Aeromonas. hydrophila</i> cultivada a 28°C em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após 10 dias de contato	13
FIGURA 3	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Santos, 2004)	20
FIGURA 4	Figura esquemática da possível ação dos compostos fenólicos na célula bacteriana (adaptado de Burt, 2004)	22
FIGURA 5	Aspecto geral de folhas frescas (A) e de folhas secas (B) de <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão).....	23
FIGURA 6	Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).....	24
FIGURA 7	Aspecto geral de plantas frescas (A) e de folhas secas (B) de <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho).....	26
FIGURA 8	Estruturas químicas do timol (A) e do carvacrol (B)	27
FIGURA 9	Aparelho de Clevenger modificado	30
FIGURA 10	Valores médios (•) e estimados (-) do diâmetro de halos de inibição de <i>Aeromonas hydrophila</i> em função das diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	41
FIGURA 11	Valores (•) e estimados (-) do diâmetro de halos de inibição de <i>A. hydrophila</i> em função das diferentes concentrações do óleo essencial de tomilho.....	42
FIGURA 12	Contagem de células de <i>Aeromonas. hydrophila</i> presentes em cupons de aço inoxidável AISI 304, ao longo de 10 dias.....	44
FIGURA 13	Resultados de contagens de <i>Aeromonas hydrophyla</i> em cupons de aço sem tratamento e com tratamentos em diferentes temperaturas de exposição	47

RESUMO

MILLEZI, Alessandra Farias. **Ação bactericida de detergente-sanificante à base de óleos essenciais sobre biofilme de *Aeromonas hydrophila***. 2009. 70 pDissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A maioria das bactérias, quando em seus habitats, são encontradas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a diversas superfícies, como o aço inoxidável, compondo um biofilme, isto é, um ecossistema estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada. Essas comunidades agem como ponto de contaminação, além de outros prejuízos, como a corrosão. Neste contexto, *Aeromonas hydrophila* se destaca pela capacidade de formar biofilme, sendo uma bactéria deterioradora e relatada como patógeno emergente. Atualmente, a utilização de óleos essenciais para o controle do crescimento microbiano tem se mostrado eficiente como nova alternativa. Dessa forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o efeito bactericida dos óleos essenciais de *Thymys vulgaris* (tomilho) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre biofilme formado por *Aeromonas hydrophila* em cupons de aço inoxidável AISI 304, utilizando o leite desnatado UAT como substrato. Os óleos de tomilho e capim-limão foram extraídos pela técnica de hidrodestilação. Para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI), utilizaram-se as concentrações 0; 3,90; 7,80; 15,60; 31,20; 62,50; 125,00; 250,00 e 500,00 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. A metodologia empregada foi a de difusão em cavidade em ágar. Para a formação do biofilme, foram inoculados em placas de Petri contendo os cupons em 60 mL de leite e cerca de 10^5 UFC.mL⁻¹ e incubados, a 28°C, por 10 dias. O processo de adesão e formação de biofilme foi acompanhado retirando-se cupons do leite a cada 48 horas, até completar 10 dias. Após esse período, realizou-se o teste de sensibilidade do biofilme utilizando-se a CMI de cada óleo adicionado em NaOH 1%. Os cupons contendo o biofilme foram tratados, por 15 minutos, nas temperaturas de 25°C e 40°C. A CMI encontrada para o óleo essencial de tomilho foi de 62,50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e, para o óleo de capim-limão, de 31,20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Pelo teste de Scott-Knott não houve diferença significativa entre os tratamentos com os óleos de capim-limão e tomilho, porém, ambos reduziram com mais eficiência, diferindo significativamente do controle NaOH. O tratamento com a solução de capim-limão reduziu 4,51 e 5,53 ciclos log o biofilme, nas temperaturas de 25°C e 40°C, respectivamente. O detergente de tomilho também reduziu o biofilme, a níveis de 3,84 ciclos log, em temperatura de 25°C e a 5,22, em 40°C. Assim, a utilização das soluções de capim-limão e tomilho foi promissora na redução do biofilme de *A. hydrophila*.

Comitê de orientação: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Orientadora), Maria das Graças Cardoso – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

MILLEZI, Alessandra Farias. **Action bactericidal dedetergente-sanificante the base of essential oils on biofilme of *Aeromonas hydrophila*** 2009. 70 p. Dissertation (Master's degree in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG

Most of the bacteria when in their natural habitats they are found in communities of different complexity degrees, associated to several surfaces, as the stainless steel, composing a biofilm, that is, an ecosystem structured highly dynamic, that it acts of way coordinate. These communities act about point of constant contamination, besides other damages as the corrosion. In this context, *Aeromonas hydrophila* stands out for his/her capacity to form biofilm, being a bacterium potentially deteriorate and told as emerging pathogenic. Nowadays, the use of essential oils for the control of the microbial growth has if shown efficient as a new alternative. Before the exposed, the present work had as objective extracts essential oils from the plants *Thymys vulgaris* (thyme) and *Cymbopogon citratus* (grass-lemon) and to determine the bactericidal effect of the oils in biofilme formed by *Aeromonas hydrophila* in coupons of stainless steel AISI 304 using the skimmed milk UHT as substratum. The essential oils of thyme and grass-lemon were extracted for the hydrodynamic technique. For the determination of the Minimum Concentration Inhibit the concentrations 4, 8, 16, 31, 62, 125, 250 and 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ were used. The used methodology was the one of diffusion in cavity in Agar. The number of cells for mL was determined by the curve pattern. To induce the formation of the biofilm they were inoculated in the milk about 10^5 UFC.ml⁻¹ in plates containing 60 mL of milk, incubated to 28°C by 10 days. Every 48 hours he/she took place the plaque and counting. For the test of sensibility of the biofilm formed after 10 days of cultivation CMI of each essential oil was used added in NaOH 1%. The coupons' containing the biofilm was treated by 15 minutes in the temperatures of 25°C and 40°C. CMI for the essential oil of thyme was of 62 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ and for the grass-lemon oil it was 31 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. For the test of Scott-Knott there was not significant difference among the treatments with the grass-lemon oils and thyme, however both reduced with more efficiency, differing significantly of the control NaOH. The treatment with the solution of grass lemon reduced 4,51 and 5,53 cycles log of the biofilm of *A. hydrophila* respectively in the temperatures of 25°C and 40°C. The thyme detergent also presented reduction of the biofilm, at levels of 3,84 cycles log in temperature of 25°C and 5,22 in 40°C.

Guindace Commitee: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Adviser), Maria das Graças Cardoso – UFLA (Co-adviser).

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos compreendem o grupo de seres vivos de dimensões microscópicas, que podem viver na natureza isolados ou agregados, formando comunidades de células, nas quais a maioria das bactérias vivem em comunidades, formando associações em diferentes graus de complexidade, aderindo-se a variadas superfícies, tanto bióticas como abióticas, geralmente compondo um biofilme, que pode ser formado por populações de mesma espécie (monoespécie) ou por múltiplas espécies (multiespécie).

A adesão bacteriana em superfície ocorre amplamente, tanto na natureza, quanto na área biomédica e nas indústrias, ocasionando grandes problemas. As bactérias podem ter sua adesão facilitada por apêndices celulares, tais como pili, flagelos e fimbrias, os quais proporcionam melhor contato célula-superfície.

Existem vários conceitos para definir biofilme. Harrison et al. (2005) o definem como uma comunidade de células bacterianas estruturadas irregularmente, aderidas na superfície envolvida em matriz composta por substância polimérica extracelular. Existem várias teorias para a formação do biofilme, as quais se baseiam em duas fases: reversível, na qual atuam ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals e irreversível, em que ocorrem a adesão física da célula à superfície, a maturação do biofilme e o retorno parcial das células ao meio. Essas duas fases envolvem o desenvolvimento de um biofilme em etapas sequenciais: adesão inicial à superfície, formação de microcolônias e, na maioria das vezes, diferenciação das microcolônias em macrocolônias que estão envolvidas na matriz de exopolissacarídeo, o que constitui o biofilme maduro. Vários fatores são capazes de influenciar as etapas de formação do biofilme, tais como: temperatura, pH, disponibilidade de

nutrientes, concentração de células suspensas e propriedades físicas da superfície.

As superfícies envolvidas no processamento de alimentos, como aço inoxidável, borracha, vidro, teflon e plástico, apresentam características favoráveis para a formação de biofilme.

Nas indústrias de alimentos, a formação de biofilme microbiano na superfície de equipamentos e utensílios usados no processamento dos alimentos resulta em graves problemas, já que pode ser fonte de contaminação do alimento, comprometendo a qualidade final do produto e a saúde do consumidor.

Sabe-se que, na indústria de alimentos, os laticínios enfrentam grandes problemas para a obtenção de produtos de boa qualidade. Vários fatores contribuem para esse fato, sendo um deles a característica nutricional do leite, que favorece o crescimento microbiano.

O leite é um alimento constituído de proteínas, gorduras, carboidratos, minerais, enzimas, pH neutro e alta atividade de água. Essas características favorecem a adesão e a formação de biofilme de muitas bactérias patogênicas e deteriorantes. Entre os microrganismos passíveis de contaminação da produção leiteira, *Aeromonas hydrophila* é considerada emergente, sendo potencial produtor de lipases e proteases capazes de alterar a qualidade do leite UAT, até mesmo após o seu processamento térmico. Paralelamente, estudos vêm relatando ser essa bactéria formadora de biofilme e potencialmente patogênica ao ser humano.

Atualmente, há tendência, no mercado, de utilizar produtos naturais que possuam efeitos antimicrobianos em relação a microrganismos patogênicos, deterioradores e formadores de biofilme.

Os consumidores optam pelo uso de alimentos naturais, com baixo índice de aditivos sintéticos, que podem conter agentes carcinogênicos. Os óleos essenciais encontrados em plantas condimentares e medicinais têm despertado o

interesse das indústrias alimentícias, sendo alvos de diversos estudos envolvendo bactérias e fungos, uma vez que o efeito antimicrobiano desses óleos já foi comprovado.

O Brasil possui elevada biodiversidade de plantas condimentares e medicinais já empregadas em indústrias cosméticas, de alimentos e farmacêuticas. Dentre essas plantas destacam-se as espécies *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris*, pela produção de óleos essenciais e também por suas características antimicrobacterianas. A utilização desses óleos essenciais contra microrganismos surge como alternativa para evitar a formação de biofilme ou reduzir os índices de contaminação em alimentos.

Diante do exposto, objetivou-se, com a realização deste trabalho, extrair óleos essenciais das plantas *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e determinar o efeito bactericida dos óleos em biofilme formado por *Aeromonas hydrophila* em cupons de aço inoxidável AISI 304, utilizando o leite desnatado UAT como substrato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Adesão microbiana e formação de biofilme

Os biofilmes são comunidades complexas de microrganismos que se desenvolvem em superfícies de ambientes diversos. Eles contaminam produtos industriais, próteses dentárias, cateteres, ventiladores e implantes médicos, podendo causar infecção em humanos, animais e plantas (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002).

As bactérias formadoras de biofilme podem viver de forma livre (bactérias planctônicas) ou em comunidades, aderidas a um substrato (bactérias sésseis) (Shirreff et al., 2002). As células bacterianas podem formar biofilme em superfícies de aço inoxidável, vidro, alumínio, teflon, materiais de náilon e borracha encontrados em ambientes utilizados para processar alimentos (Andrade & Macêdo 1996).

A formação de biofilme (Figura 1) ocorre em uma série de eventos subsequentes (O'Toole et al., 2000). Várias teorias são propostas, descrevendo a formação de biofilmes. Marshall et al. (1971) propõe que a adesão é um processo que ocorre em duas etapas. Na primeira, o processo é ainda reversível, em que ocorre contato da célula com a superfície, por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Esta interação é relativamente fraca e pode ser rompida facilmente. Na segunda etapa, a fase denominada irreversível, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou proteica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix.

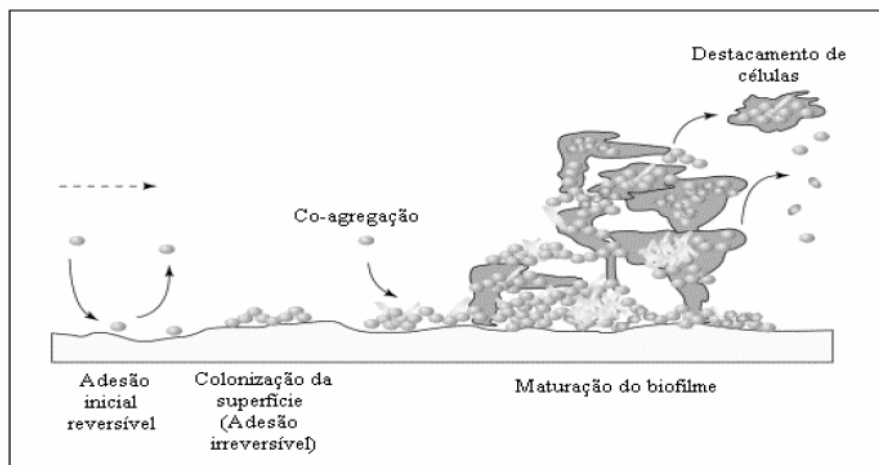


FIGURA 1 Ciclo de desenvolvimento de um biofilme (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001 adaptado por Boari, 2008).

De acordo com Andrade et al. (1998), é necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 ; já outros autores, como Wirtanem et al. (1996), consideram biofilme o número de células aderidas de 10^3 e 10^5 por cm^2 . Parizzi (1998) considera biofilme quando o número de células aderidas oscila entre 10^6 e 10^7 células por cm^2 .

Characklis (1984) caracteriza o mecanismo de formação do biofilme em cinco etapas. Inicialmente, ocorre o condicionamento da superfície pela absorção de material orgânico, em seguida, o transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência, iniciando-se, assim, o processo de adesão bacteriana por atração eletrostática. Sequencialmente, ocorre o crescimento celular, seguido de colonização e adesão irreversível. Por fim, o biofilme apresenta alta atividade metabólica, com liberação de células localizadas na periferia.

A teoria proposta por Notermans et al. (1991), indica que a formação do biofilme ocorre em três etapas, sendo a primeira a fixação da bactéria, seguida

do transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência, promovendo a consolidação do microrganismo na superfície, para, posteriormente, ocorrer a colonização e crescimento da bactéria. Já para Hall-Stoodley & Stoodley (2002), a formação de biofilme é um processo linear que começa quando células bacterianas planctônica prendem-se a uma superfície. Esta aderência é seguida pela multiplicação celular atingindo o estágio maduro, que se apresenta estruturalmente complexo (Costerton & Stewart, 2001).

Em todas as teorias propostas para a formação de biofilme, a matriz de glicocálix possui função importante em sua fisiologia, agindo na aderência das células e como uma barreira de defesa a elas. A matriz ajuda as células do biofilme a resistirem a condições de estresse, como a depleção de água e nutrientes, presença de biocidas e de outros agentes antimicrobianos (Kives et al., 2006).

A matriz de glicocálix constitui-se de exopolissacarídeos, os quais são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, estruturais e químicas diferentes, sendo produzidos por grande variedade de microrganismos. Alguns exopolissacarídeos são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano, enquanto outros são sintetizados durante a fase logarítmica ou estacionária (Souza & Garcia-Cruz, 2004). Estes são considerados componentes-chave que determinam a estrutura e a integridade funcional do biofilme microbiano, agregado pela formação tridimensional; agem também como adesivo e barreira defensiva, protegendo as células para que não sejam destacadas pelo fluxo de substâncias. Auxiliam também em condições de estresse celular, como a diminuição e a exaustão de nutrientes e água, a presença de agentes antimicrobianos e condições ambientais inadequadas (Kives et al., 2006).

O desenvolvimento do biofilme e a liberação de células podem ser regulados pela expressão de um gene dependente da densidade celular, controlado por moléculas sinalizadoras, tais como homoserina lactona acilada

(AHLs), para bactérias gram-negativas e peptídeos específicos, para bactérias gram-positivas (VanHoudt & Michiels, 2005).

2.2 Fatores que influenciam a adesão microbiana

As várias fases de interações microbianas com a superfície parecem requerer a produção de estruturas extracelulares microbianas que auxiliam na adesão inicial e na manutenção da estrutura do biofilme (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002).

A habilidade de microrganismos de aderirem e se multiplicarem em superfícies sob condições favoráveis pode levar à formação de biofilme, sendo esse um processo dinâmico e com mecanismos diferentes envolvidos na aderência e crescimento. Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) possuem papel importante na aderência e na colonização dos microrganismos nas superfícies (Kumar & Anand, 1998).

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

Os EPS sintetizados por células microbianas variam muito na sua composição e, conseqüentemente, nas propriedades químicas e físicas apresentadas. Os polissacarídeos são, essencialmente, cadeias moleculares longas e finas, com massa molecular na ordem de $0,5-2,0 \times 10^6$ Da, que podem estar associados de formas diferentes. Os EPS presentes nos biofilme assemelham-se aos polímeros sintetizados pelas mesmas células planctônicas. A quantidade de EPS sintetizado nos biofilmes depende da disponibilidade de

substratos de carbono e do balanço entre carbono e outros nutrientes limitantes (Silankorva, 2004). A função do EPS na formação de biofilme é unir as células bacterianas em microcolônias pela matriz extracelular “substância polímera” ou “polissacarídeo extracelular (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002). A química do EPS é complexa e inclui polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002).

O pH e a temperatura da superfície de contato também podem ter influência no grau de adesão de microrganismos. *Pseudomonas fragi* mostrou máxima adesão sobre superfícies de aço, quando em pH na faixa de 7 a 8, ótimo para o metabolismo da célula (Stanley, 1983). Semelhantemente, o efeito de pH na capacidade de adesão de *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes* também foi demonstrado por Herald & Zottola (1988). Estes autores também observaram o efeito da temperatura, em que *Y. enterocolitica* aderiu melhor sobre as superfícies de aço quando incubada a 21°C, em detrimento das temperaturas de 35°C ou 10°C.

Diversos estudos demonstram a hidrofobicidade da superfície como um fator importante no processo de adesão. A hidrofobicidade representa o grau de capacidade de molhadura da superfície em meio aquoso, sendo a adesão favorecida pelas superfícies hidrofóbicas, as quais possam entrar em contato pela compressão da camada de água e das mesmas (Sousa, 2005).

Estudos de Davies (1998), utilizando biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, indicam que o *quorum sensing* é importante para a formação da estrutura em biofilmes. *Quorum sensing* é um mecanismo intercelular de sinalização que atua na regulação de certas atividades celulares, como a produção de metabólitos secundários de modo dependente da densidade celular, observado em culturas planctônicas (Salmomd et al., 1995).

2.3 Superfícies envolvidas

Sabe-se que nenhum dos materiais normalmente empregados na indústria de alimentos apresenta capacidade de impedir os processos iniciais de formação do biofilme, bem como o desenvolvimento de seu ciclo (Kingshott et al., 2003).

A capacidade de uma superfície de resistir à corrosão é de grande importância, uma vez que depressões provocadas por elas podem diminuir acentuadamente a limpabilidade (Flint et al., 2000). Segundo Wirtanen et al. (1996), a topografia da superfície, embora importante, no que diz respeito à adesão inicial, parece ter participação menor na formação do biofilme, pois as microrranhuras e microfendas seriam mais interessantes ao biofilme maduro, pois poderiam proteger alguma porção da comunidade do biofilme de atritos mecânicos e, em casos de danos mecânicos, a porção remanescente poderia regenerar a estrutura.

As superfícies comumente utilizadas para o processamento de alimentos, como aço inoxidável, polietileno, propileno, policarbonato, aço-carbono, teflon, madeira e vidro, permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilme. As características macroscópicas e, particularmente, as microscópicas das superfícies são determinantes para maior ou menor adesão microbiana, com reflexos na contaminação dos alimentos por microrganismos deterioradores ou patogênicos (Andrade, 1996).

O aço inoxidável corresponde a uma liga composta por ferro e cromo. Em se tratando do AISI 304, o mais utilizado na indústria de alimentos, esta liga contém de 18%-20% de cromo, 8,0%-10,5% de níquel e o restante, de ferro. O cromo presente nesta liga apresenta alta afinidade pelo oxigênio e, quando estes dois elementos se combinam, forma-se, na superfície do aço inoxidável, pelo fenômeno denominado passivação, uma fina camada de óxido de cromo,

chamada de camada passiva. Este filme formado, com até 40 Å de espessura, é o responsável pela característica de resistência à corrosão e hidrofobicidade do material. Dessa forma, quanto mais hidrofóbica for a célula, maior sua capacidade de se ligar diretamente ao aço inoxidável (Macêdo, 2004).

Numerosos trabalhos têm sido publicados, tratando da influência das características do aço inoxidável sobre incrustações, limpeza e desinfecção. Na maioria dos casos, os autores referem-se a aspectos qualitativo e quantitativo da superfície de contato, como, por exemplo, topografia (Frank & Chmielewski, 2001; Medilanski et al., 2002; Woodling & Moraru, 2005).

2.4 Microrganismos envolvidos na formação de biofilme

O biofilme pode ser formado por uma única espécie bacteriana ou por várias. Estima-se que o biofilme dental contenha mais de 500 espécies de bactérias diferentes, nos estágios mais tardios (Mah & O'Toole, 2001). Dentre os microrganismos que podem participar do processo de adesão e gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, estão *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *Micrococcus* sp e *Enterococcus faecium* (Criado et al., 1994; Andrade et al., 1998).

Em tubulações, na indústria de alimentos, tem ocorrido a predominância do gênero *Arthrobacter*, correspondendo a 20% das bactérias isoladas das superfícies das tubulações. Contudo, outros gêneros podem ser observados, tais como: *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* e *Achromobacter* (Oliveira et al., 2006).

Segundo Silva Jr. (2005), os microrganismos capazes de formar biofilme e que são comumente encontrados são: *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *Micrococcus* sp., *Bacillus cereus*, *Enterococcus* sp., *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. A pesquisa de algumas dessas bactérias nas análises microbiológicas de amostras provenientes de superfícies de contato com

alimentos (utensílios e equipamentos) é de grande importância para avaliação da eficácia dos processos e produtos utilizados para higiene (lavagem e desinfecção) nas unidades de alimentação e nutrição (UANs).

Figueiredo (2000), utilizando modelo de circuito de processamento de leite empregando cupons de prova de aço inoxidável, mostrou que cultura de *P. aeruginosa*, após 12 horas de contato, atinge valores na ordem de 10^5 UFC/cm² na superfície dos cupons.

Listeria innocua L6a e *S. aureus* ATCC 6538 apresentam capacidade de adesão a superfícies de aço inoxidável AISI 204, propileno (utilizado na fabricação de placas para corte de carne e legumes) e policarbonato (utilizado na fabricação de mamadeiras (Parizzi, 1998). *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 também mostrou capacidade de aderir e formar biofilme em aço inoxidável AISI 304, quando cultivado em leite desnatado UAT (Boari, 2008). Tebaldi (2008), cultivando *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* em leite UAT, à temperatura de refrigeração, mostrou que *P. fluorescens* apenas aderiu em aço inoxidável AISI 304, contudo, *P. aeruginosa* foi capaz de formar biofilme.

Sharma & Anand (2002) caracterizaram a constituição da microbiota formadora de biofilme em uma indústria de processamento de leite, relatando a presença de patógenos, inclusive *Staphylococcus aureus* coagulase-positivo e bactérias entéricas, como *Shigella*, *Escherichia coli* e *Klebsiella*.

Marques et al. (2007) relatam a formação de biofilme por *S. aureus* em aço inoxidável AISI 304, quando cultivado, a 37°C, em TSB. Já Rezende (2005) demonstrou que *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* formaram biofilme em vidro e aço inoxidável, quando incubados em suas temperaturas ótimas de crescimento e meio de cultura TSB.

2.4.1 *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila é uma espécie gram-negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, móvel, catalase positiva, oxidase positiva com temperatura ótima de desenvolvimento de 28°C (Josep & Carnahan, 2000; Lai et al., 2007). Apresenta distribuição ubíqua no ambiente, podendo estar presente nos mais diferentes tipos de matérias-primas e alimentos, como pescado e derivados, carnes e derivados, e alimentos manipulados com água (Suñen et al., 2003).

Microrganismos dessa espécie são psicrotróficos, ou seja, mesmo com temperatura ótima para o crescimento em torno de 28°C, são capazes de se desenvolver nas temperaturas empregadas na conservação de alimentos sob refrigeração de 4° a 7°C (Braun & Sutherland, 2005). Dessa forma, a refrigeração do leite cru em tanques de resfriamento por expansão acaba favorecendo o desenvolvimento de psicrotróficos, como *Aeromonas* spp. (Marchand et al., 2007).

A presença de *A. hydrophila* na cadeia leiteira vem sendo bastante relatada. Bulhões & Rossi Junior (2002), ao estudarem a prevalência deste microrganismo no queijo minas frescal artesanal, detectaram sua presença em 51,25% das amostras (82/160), em quantidades que variaram entre $5,0 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^5$ UFC. Segundo esses, as precárias condições de higiene no setor primário e o possível uso de água não tratada seriam pontos críticos à sua inserção na cadeia produtiva.

Carneiro & Rossi Junior (2006), em estudos sobre prevalência de *Aeromonas* spp. no fluxograma de beneficiamento de leite tipo A, isolaram microrganismos deste gênero em 90% das amostras de leite cru (18/20), em 30% das amostras de leite na saída do pasteurizador (6/20), em 40% das amostras de leite do tanque de abastecimento do empacotador (8/20) e em 25%

das amostras de leite já aptas ao consumo (5/20). *Aeromonas hydrophila* estava presente em 21,62% das amostras analisadas.

Estudos recentes também relatam *A. hydrophila* como formadora de biofilme em diversas superfícies, especialmente na indústria de alimentos. Boari (2008) comprovou a formação de biofilme pela bactéria em aço inoxidável AISI 304 (Figura 2), utilizando o leite como substrato.

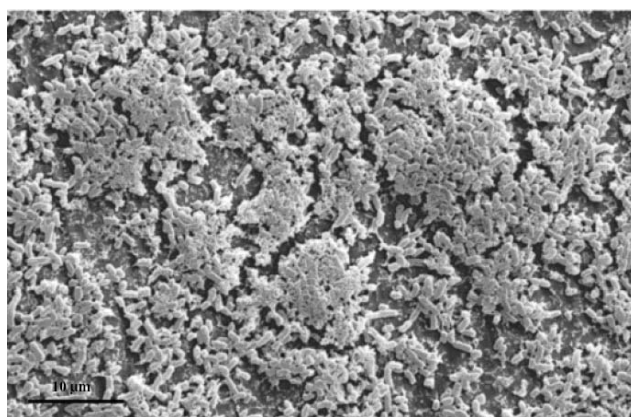


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de *A. hydrophila* cultivada, a 28°C, em cupom de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se leite UAT desnatado, após 10 dias de contato (Boari, 2008).

2.5 Biofilmes na indústria

Na indústria de alimentos, bactérias formadoras de biofilme são importantes na contaminação de alimentos. Se, após limpeza e desinfecção, a matriz exopolissacarídea não for removida completamente, bactérias se aderem com maior facilidade, formando biofilme (Kives et al., 2006), sendo fonte potencial na contaminação de produtos processados (Sharma & Anand, 2002).

A adesão e a formação de biofilmes bacterianos podem ser indesejáveis, sob vários aspectos, numa planta de processamento. Estas podem diminuir a transferência de calor em trocadores de calor, diminuir o fluxo em tubulações, desencadear processos corrosivos e, principalmente, tornarem-se fonte de contaminação microbiana (Arcuri, 2000).

Estragos em equipamentos pela biocorrosão causada por biofilmes, contaminação de produtos pela biotransferência, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão são alguns efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos (Jass & Walker, 2000) e representam perdas significativas para as indústrias em âmbito global. Tais problemas são agravados pela resistência acrescida a métodos de desinfecção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparando com células livres (Simões et al., 2004).

Várias técnicas estão sendo adotadas para o estudo de biofilme e/ou controle, nas quais as estratégias de prevenção e controle são importantes na indústria de alimentos. As mais utilizadas são a higienização adequada de equipamentos, a escolha de sanificantes, o uso correto e a seleção de detergentes e sanificantes (Kumar & Anand, 1998).

De acordo com Arcuri (2000), um biofilme presente numa superfície com resíduos de alimentos impede a efetiva penetração do sanificante, não ocorrendo a eliminação ou redução efetiva dos microrganismos.

Os impactos econômicos causados pelos biofilmes são estimados em 1% do PIB em países industrializados e podem ser classificados nas seguintes categorias: superdimensionamento de processos ou estruturas para efeitos deletérios de biofilmes, custos de medidas de controle de biofilmes (sistemas de limpeza química ou mecânica, biocidas, etc.), custos de interrupção da produção ou de redução da eficiência de processos e aumento da incidência de doenças (Schneider, 2007).

O crescimento do interesse e da importância de biofilmes na indústria de alimentos deve-se, principalmente, ao desenvolvimento de melhores métodos de detecção, à tendência de produzir alimentos com vida útil cada vez mais longa e à operação de equipamentos por longo turno durante processamento e à saúde pública (Chacracklis & Marshall, 1990; Zottola, 1994).

Segundo Oliveira (2006), a ocorrência de biofilme não apresenta somente problemas na indústria de alimentos. Há casos em que há aplicabilidade do biofilme, como em reatores (biorreatores) na produção de alimentos fermentados, como na obtenção de vinagre e picles. Além disso, os biofilmes são empregados em tratamentos anaeróbios e aeróbios de efluentes domésticos e industriais e no processo de tratamento de água potável, removendo nitrogênio e carbono biodegradável.

2.6 Higienização

Segundo Macêdo (2004), a higienização divide-se em duas etapas muito bem definidas: a limpeza e a sanificação. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies. A sanificação objetiva eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de saprófitas ou alteradores a níveis considerados seguros. A limpeza consegue reduzir a carga de microrganismos das superfícies, mas não a níveis considerados satisfatórios, o que transforma a sanificação em etapa indispensável. A higienização é o resultado do envolvimento de um conjunto de fatores, como: i) energia química; ii) energia mecânica; iii) energia térmica e iv) o tempo de contato entre o detergente e ou sanificante e a superfície que sofre o processo de higienização. A integração entre os fatores implicará numa maior eficiência da higienização.

A eficiência do procedimento de limpeza é fundamental no controle da adesão de microrganismos, pois limpezas inadequadas podem interferir na ação

de sanificantes, dificultando a eliminação de bactérias aderidas remanescentes nas superfícies.

A estratégia que pode ser empregada para prevenir a formação de biofilme é utilizar regularmente o processo de desinfecção, sempre antes do início da formação do biofilme. Esse processo deve ser executado rapidamente, pois a fase inicial da aderência dos microrganismos e a formação do biofilme à superfície ocorrem rapidamente, levando apenas algumas horas (Meyer, 2003).

2.6.1 Detergentes alcalinos

Os detergente alcalinos, como hidróxido de sódio (NaOH), são utilizados para remover gorduras e proteínas (Andrade & Macêdo, 1996). A ação sobre as proteínas é basicamente pelo pH; no ponto isoelétrico, as proteínas possuem carga elétrica neutra e, nesse caso, os resíduos protéicos estão insolúveis na água. Quando o pH de resíduos passa a ter carga elétrica negativa, ocorre uma repulsão entre eles, mantendo-os em solução aquosa, onde são arrastados pela enxaguagem (Lehninger et al., 2006).

De acordo com Andrade & Macedo (1996), o hidróxido de sódio tem o maior teor de alcalinidade sódica, apresentando pH próximo a 13, quando a 1% (p/v), promovendo a saponificação de lipídeos e a solubilização de proteínas; possui baixa ação de molhagem, nenhuma eficácia na eliminação da dureza da água, poder corrosivo muito forte sobre alumínio, cobre e superfícies galvanizadas, contudo, não ataca o aço inoxidável.

2.6.2 Sanificantes

A sanificação complementa o procedimento de higienização, assegurando a qualidade microbiológica das superfícies (Andrade, 1996). Trata-se de um procedimento que elimina ou reduz os microrganismos patogênicos até níveis suportáveis sem risco à saúde (Silva Junior, 2005).

Os sanificantes são substâncias ou preparações destinadas à higienização domiciliar ou industrial, em ambientes coletivos e ou públicos, em lugares de uso comum e no tratamento de água (Silva Junior, 2005).

Deve-se selecionar sanitizantes que sejam aprovados pelos órgãos competentes, como os ministérios da Saúde e da Agricultura, apresentem amplo espectro de ação antimicrobiana e sejam capazes de destruir rapidamente os microrganismos e estáveis sob variadas condições de uso em que haja baixa toxicidade e corrosividade (Andrade, 1996).

A redução do número de microrganismos, quando se utilizam sanificantes químicos, depende, entre outras coisas, das propriedades biocidas do agente, da concentração, da temperatura e do pH, bem como do grau de contato entre o sanificante e os microrganismos, que pode ser conseguido por agitação, tubulência (uso de ultrassom) e baixa tensão superficial. Ressalta-se que os vários microrganismos apresentam resistência diferente aos sanificantes químicos (Oliveira, 2006).

2.7 Óleos essenciais: aspectos gerais

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Constituem misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas (Santos, 2004).

São, geralmente, incolores ou ligeiramente amarelados; poucos são os óleos que apresentam cor, como o óleo volátil de camomila, de coloração azulada, pelo seu alto teor em azulenos. Estes são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais (Simões et al., 2004).

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

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

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para determinado órgão e característica do seu estágio de desenvolvimento. Mas, as condições ambientais causam variações significativas. Um exemplo é a influência do ciclo vegetativo, em que a concentração de cada um dos constituintes do óleo pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e os tipos de cultivo também interferem na composição química dos óleos essenciais (Williams & Stockley, 1998). A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (Silva Junior & Verona, 1997).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais

como flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou, ainda, nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (Robbers et al., 1997; Oussalah, 2006).

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias. O metabolismo secundário diferencia-se do metabolismo primário basicamente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo específico de determinados grupos (Martins et al., 1994). Essas substâncias podem estar presentes na planta durante todo o seu ciclo vegetativo ou só serem produzidas mediante estímulos específicos. Assim, a regulação do metabolismo secundário depende da capacidade genética da planta em responder a estímulos internos ou externos e da existência desses estímulos no momento apropriado (Martins et al., 1994).

A origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via intermediários ácido chiquímico e acetato (Figura 4).

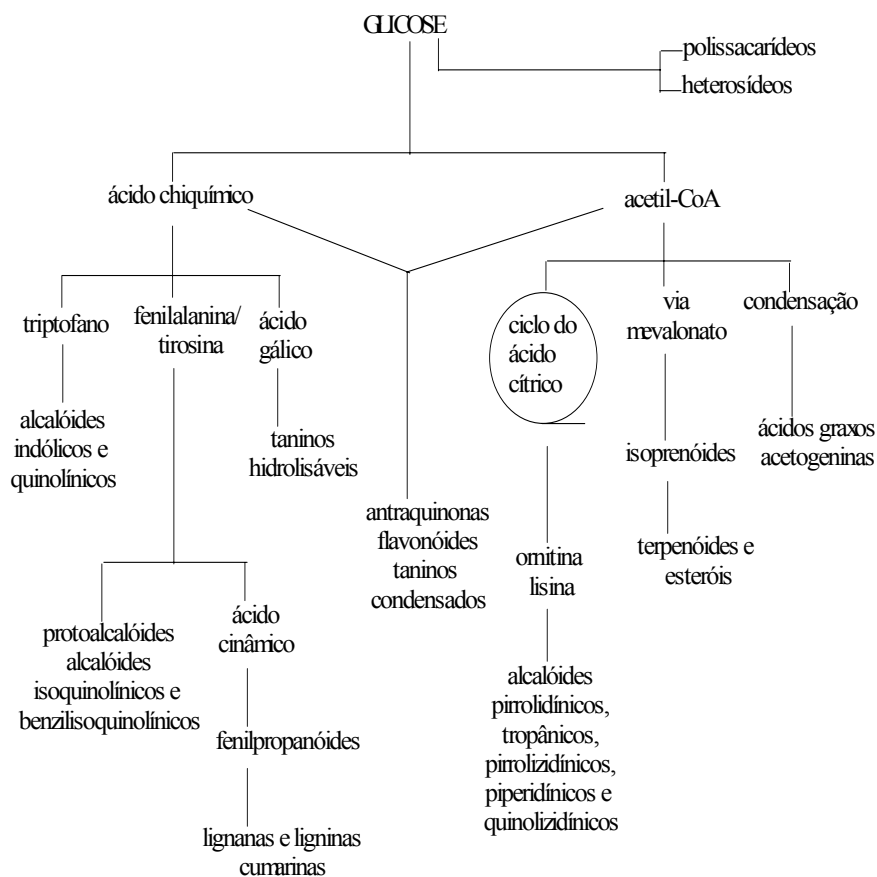


FIGURA 4 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Santos, 2004).

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de condimentos têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (Tassou et al., 2000; Mendonça, 2004). Quando a finalidade desses óleos é inibir o crescimento microbiano, as concentrações

devem ser maiores que aquelas utilizadas para realçar o sabor e o aroma dos alimentos. Para Shelef (1983), a concentração para inibir o crescimento microbiano é de 1% a 5%, ao passo que, para fins culinários, utilizam-se de 0,5% a 1%, o que não é suficiente para inibir a atividade microbiana.

Os condimentos apresentam-se como fonte promissora de agentes antimicrobianos para serem utilizados em produtos cárneos, visando assegurar um produto final de melhor qualidade microbiológica, com conseqüente aumento da vida de prateleira. Embora os óleos essenciais sejam bastante estudados, a sua utilização como substância antimicrobiana é bastante limitada, pois eles conferem ao alimento sabor característico, e doses eficazes contra microrganismos podem mudar a aceitabilidade do produto. Como conseqüência, há uma demanda crescente de conhecimento das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos óleos essenciais, para que possa atingir o balanço entre a eficácia como agente antimicrobiano e a aceitabilidade sensorial (Koutsoumanis et al., 1998).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais são pouco conhecidos. Considerando o grande número de diferentes compostos químicos presentes nos óleos essenciais, provavelmente, sua atividade não é atribuída à apenas um mecanismo específico. Por sua característica hidrofóbica, estes compostos atuam nos lipídios da membrana das células, modificando sua estrutura e tornando-a mais permeável, podendo ocorrer a passagem de íons e ou outras substâncias. Até momento, dois mecanismos foram propostos para explicar a ação dos componentes fenólicos na membrana celular (Figura 3). As moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo-proteína ou, ainda, pode haver interação direta com compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas de membrana (Burt & Reinders, 2004).

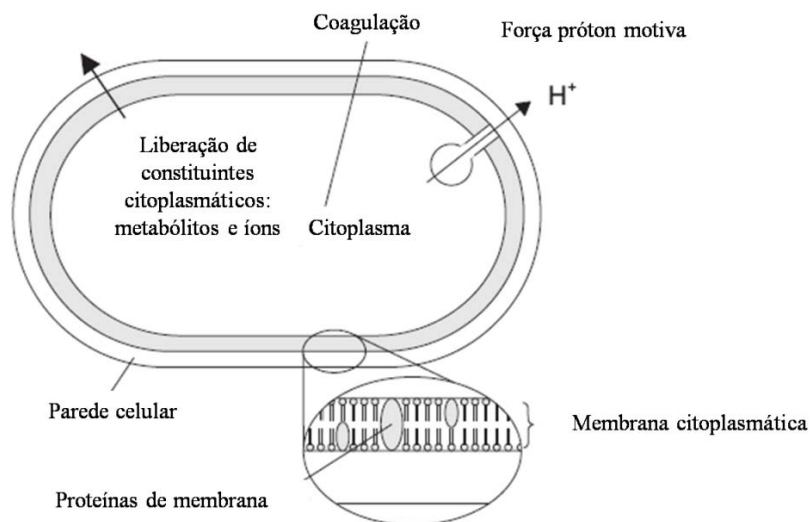


FIGURA 3 Figura esquemática da possível ação dos compostos fenólicos na célula bacteriana (adaptado de Burt & Reinders, 2004).

2.8.1 Espécie *Cymbopogon citratus*

Planta aromática e medicinal, a espécie *Cymbopogon citratus* pertence à família Gramineae, originária da Índia. É conhecida no Brasil como capim-cidrô, capim-cheiroso e erva-cidreira. Desenvolve-se bem em regiões de climas quentes, possui aroma semelhante ao do limão e sabor ardente. De acordo com a história, foi introduzido no Brasil no período colonial, se estendendo por todas as regiões devido à fácil adaptabilidade ao clima e por não ser exigente quanto ao tipo de solo (Teske & Trentini., 1997; Negraes, 2003).

As folhas são moles, basais, planas, glabras, estreitas e longas (0,50 a 1 m), invaginantes, aromáticas e paralelinérveas (Figura 5 A e B). Têm lâmina de cor verde-grisácea com veios bem visíveis na face inferior e de cor verde-brilhante e lisa na face superior. As flores são em espiguetas sésseis que se

situam sobre ráquis que formam racimos curtos (1 a 1,50 cm) os quais, por sua vez, formam panículas contraídas, bracteosas e terminais. O florescimento é raramente observado no Rio Grande do Sul, Brasil (Castro & Ramos, 2003).

No Brasil, as folhas de capim-limão apresentam largo uso popular como sedativo, sudorífero, carminativo, antipirético, diurético, antipirético e antirreumático. Há também registro de seu uso caseiro para combater diversas afecções das vias respiratórias e digestivas. Na Ásia, o chá de suas folhas é empregado popularmente como antipirético e as raízes são usadas como goma de mascar, visando a limpeza dos dentes (Figueiredo et al., 2002).

A propagação desta espécie pode ocorrer por sementes com posterior transplante, como ocorre na Índia, local onde floresce durante os meses de novembro e dezembro. No Brasil, sua propagação é vegetativa, dando-se por meio da divisão de touceiras, nos meses de setembro a janeiro (Martins et al., 1994).



FIGURA 5 Aspecto geral de folhas frescas (A) e de folhas secas (B) de *Cymbopogon citratus*

2.8.2 Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus*

O óleo essencial de capim-limão possui forte odor de limão e é amplamente utilizado na perfumaria, na fabricação de sabonetes e desodorantes, porém, seu maior emprego ocorre na indústria farmacêutica. Sua composição química é relatada em vários trabalhos, nos quais o citral, formado pelos isômeros geranial e neral (Figura 6 A e B), é citado como o constituinte majoritário, seguido por outros compostos, como o mirceno. Além desses, encontram-se vários aldeídos, como citronelal, isovaleraldeído e decilaldeído; cetonas, álcoois como o geraniol, nerol, metil heptenol e farnesol (Costa et al., 2005; Pereira et al., 2008).

O citral é citado como o responsável pelas atividades atribuídas ao óleo essencial do capim-limão, tais como larvicida, repelente de insetos e antimicrobiano, além de aplicações na indústria farmacêutica. Segundo pesquisas do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a ação larvicida da espécie no combate ao mosquito da dengue é maior que a dos inseticidas químicos utilizados. O extrato aquoso da planta fresca, assim como o do óleo essencial isolado, testado em ratos, demonstrou inibição de substâncias indutoras da dor, como carregenina e prostaglandina E-2 (Maschio, 1998).

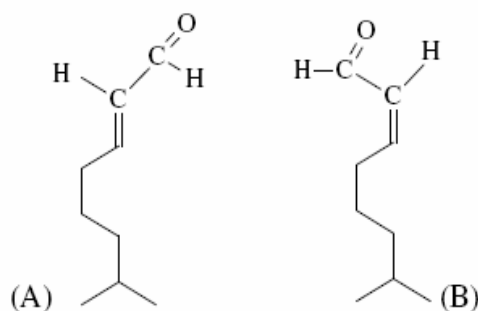


FIGURA 6 Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).

Pelas inúmeras aplicações, o óleo essencial de capim-limão tem procura no mercado nacional e internacional e seus preços têm sido considerados compensadores, embora sua produção por hectare seja baixa (comparada a outras gramíneas aromáticas) (Castro & Ramos, 2003).

De forma oposta a outras plantas aromáticas, *Cymbopogon citratus* não possui tricomas glandulares na superfície das folhas. De acordo com Lewinsohn et al. (1998), o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* é armazenado em células de óleo, ou células oleíferas, no parênquima das folhas (idioblastos). Estas têm como característica a pronunciada lignificação das paredes celulares, o que pode estar relacionado ao mecanismo de proteção do tecido por meio da formação de barreira impermeável que mantém o óleo isolado das células adjacentes.

O óleo essencial de capim-limão vem sendo muito estudado devido ao seu efeito inibitório contra microrganismos. Pereira et al. (2008) verificaram a ação bactericida do óleo essencial de capim-limão sobre *S. aureus* e *E. coli*, sendo ambas as bactérias inibidas pela ação do óleo.

2.8.3 Espécie *Thymus vulgaris*

A espécie *Thymus vulgaris* é originária da bacia mediterrânea ocidental. Trata-se de uma planta aromática, pertencente à família Lamiaceae, cultivada na Europa, especialmente na Hungria, Alemanha, Espanha e sul da França. No Brasil, é conhecida popularmente por tomilho ou timo e já se encontra completamente aclimatada (Pinto et al., 2001). Também é conhecida por outros nomes, como arca, arçanha, poejo, segurelha, tomilho-ordinário e tomilho-vulgar (Silva Junior & Verona, 1997).

Trata-se de uma planta semiarbastiva, de ciclo perene, que atinge cerca de 50 cm de altura. Desenvolve-se formando touceiras com caules lenhosos, rasteiros e tortuosos. As folhas são pequenas (Figura 7 A e B), opostas, sésseis, de formato linear-lanceolado ou oblongo e com bordos enrolados para baixo. As

flores são pequenas, de coloração rosada a branca e agrupadas em inflorescências do tipo espiga. O aroma é herbáceo e o sabor levemente picante. São amplamente empregadas na culinária como condimento (Negraes, 2003).

Além do reconhecimento dessa planta no emprego industrial, como para a produção de cosméticos, sua utilização vem crescendo amplamente, no setor alimentício e na medicina, devido ao seu excelente potencial de adaptação a variadas condições climáticas e às propriedades do seu óleo essencial (Salgado, 2005).



FIGURA 7 Aspecto geral de plantas frescas (A) e de folhas secas (B) de *Thymus vulgaris*

2.8.4 Óleo Essencial de *Thymus vulgaris*

O óleo essencial de *Thymus vulgaris* é rico em timol, apresentando traços de carvacrol (Figura 7 A e B), potentes bactericidas e fungicidas, reconhecidos cientificamente. Outros compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, já foram encontrados em extratos da planta, responsáveis pelas atividades antioxidante, expectorante, digestiva e antiinflamatória (Shan, 2002).

Em plantas da família Lamiaceae, incluindo o tomilho, os óleos voláteis podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como em pêlos glandulares (Simões et al., 2004).

Em diversos trabalhos científicos com óleos essenciais de *Thymus* sp. preconizam-se variações quantitativas dos constituintes, conforme a espécie e a variedade e relacionam-se com a época da coleta, fotoperíodo e fatores geográficos. Salgado (2005) recomenda o cultivo de *T. vulgaris* em pleno sol, pois a luminosidade é um fator preponderante no aumento do rendimento do óleo essencial.

Rota et al. (2008), na Espanha, pesquisando a constituição do óleo essencial de *T. vulgaris* por meio de cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, descreveram a presença de timol, carvacrol e p-cimeno como constituintes majoritários (Figura 8). Sacchetti et al. (2005), na Itália, utilizando a mesma metodologia de extração do óleo essencial, relatam esses mesmos constituintes como majoritários, contudo, incluíram o geraniol.

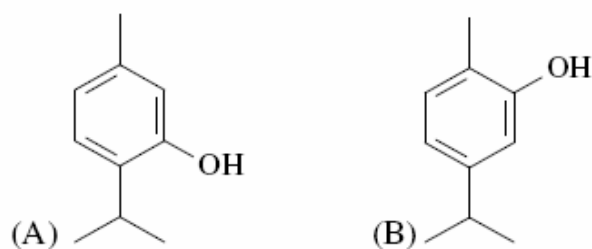


FIGURA 8 Estruturas químicas do timol (A) e do carvacrol (B).

O óleo essencial de tomilho tem apresentado resultados significativos quando testada sua atividade contra bactérias e fungos. Santurio et al. (2007) avaliaram o efeito inibitório de óleos essenciais de diversas plantas sobre sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola, verificando maior sensibilidade da bactéria ao óleo de *T. vulgaris*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e condução do experimento

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde foram realizadas as análises microbiológicas e no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química, também da UFLA, onde foram extraídos e caracterizados os óleos essenciais, e determinada a composição química e o rendimento de cada óleo.

O experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi realizada a extração dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris*; na segunda, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos essenciais e na terceira, avaliou-se o potencial bactericida dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris*, adicionados em detergente alcalino, sob a formação do biofilme por *Aeromonas hydrophila* em superfície de aço inoxidável.

3.2 Microrganismo utilizado e padronização do inóculo

A bactéria utilizada no experimento foi *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento do microrganismo, relacionando-se absorvância a 620 nm e UFC/mL. Utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície em meio de cultivo ágar triptona de ágar (TSA) e o cultivo do microrganismo em caldo infusão cérebro coração (BHI). As leituras de absorvância foram realizadas periodicamente, até obterem-se 10^9 UFC.mL⁻¹.

3.3 Óleos essenciais

3.3.1 Material vegetal

Foram utilizadas folhas frescas e secas de *Cymbopogon citratus*, obtidas no Horto de Plantas Medicinais de UFLA. As coletas foram realizadas das 8 às 9 horas da manhã, em dias ensolarados e ausentes de chuva., no mês de setembro de 2009, sob temperatura de, aproximadamente, 20°C (Martins et al., 1994). As folhas de *Thymus vulgaris* foram adquiridas no comércio de Lavras, MG.

3.3.2 Extração dos óleos essenciais

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger modificado, adaptado a um balão de fundo redondo e boca esmerilada com capacidade de 4 litros (Figura 9) (Castro et al., 2006). As folhas foram picadas e, juntamente com água destilada, foram colocadas no balão de fundo redondo, o qual foi adaptado ao aparelho de Clevenger modificado. O processo de extração foi realizado no período de duas horas, mantendo-se a solução em ebulição. Posteriormente, o hidrolato (água+óleo) foi coletado e centrifugado, a 321,8 x G, por 5 minutos, em centrífuga Fanem-Baby I Mod 206, visando à separação da fase orgânica de fase aquosa. O óleo essencial foi, então, retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro revestido com papel alumínio, previamente esterilizado.



FIGURA 9 Aparelho de Clevenger modificado

3.3.3 Determinação do rendimento dos óleos essenciais

Os rendimentos dos óleos essenciais extraídos das plantas fresca e seca foram calculados e expressos em volume de óleo por peso de folhas frescas e secas (%v/p) e com base livre de umidade (%v/p BLU) (Pimentel et al., 2006).

3.3.4 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

As análises quantitativas foram realizadas utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17^a, equipado com detector de ionização de chamas (FID), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar DB5, temperatura do injetor de 220°C, temperatura de detector FID de 240, programação da coluna com temperatura inicial de 40°C até 240°C, gás carreador nitrogênio (2,2 mL min⁻¹), taxa de split 1:10 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

3.3.5 Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos óleos foi testada pelo método de difusão cavidade placa ágar, proposto por Deans & Ritchie (1987) e modificado por Mendonça (2004). Adicionou-se uma alíquota da suspensão padronizada do microrganismo a 20 mL de TSA, à temperatura de 45°C, obtendo-se a concentração final de 10^8 UFC/mL. A mistura foi homogeneizada e vertida imediatamente sobre camada do mesmo ágar já solidificado, contido em placa de Petri. Os *slots* foram feitos na sobrecamada de Agar, utilizando-se pérolas de vidro esterilizadas com 3 mm de diâmetro. Alíquotas de 8 µL de cada diluição do óleo essencial foram depositadas nos *slots*. As diluições foram preparadas homogeneizando-se 0, 4, 8, 16, 31, 62, 125, 250 e 500 µL.mL⁻¹ de etanol. As placas foram incubadas em BOD, a 28°C, por 24 horas (Ogunwande et al., 2005). Foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados com um paquímetro. O etanol foi utilizado como controle. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4 Biofilme

3.4.1 Higienização dos cupons

Os cupons de aço inoxidável AISI 304, com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm, foram limpos individualmente com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro durante 1 hora, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada esterilizada, secos por 2 horas em estufa, a 70°C e autoclavados, a 121°C/15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

3.4.2 Adesão das células bacterianas em superfície de aço inoxidável

A cultura de *A. hydrophila* foi padronizada para cerca de 10^5 UFC.mL⁻¹. Após a padronização, 1 mL da cultura padronizada foi adicionada a 100 mL de leite desnatado UAT, contidos em placas de Petri de 140 mm de diâmetro, nas quais foram dispostos 20 cupons de aço inoxidável AISI 304. Foram utilizadas no total duas placas de Petri. As placas foram, então, incubadas a 28°C, durante 48 horas, sob agitação de 50 rpm. Após esse período, os cupons foram removidos, lavados com água destilada estéril para a remoção das células planctônicas. Seguindo-se a lavagem, os cupons foram imersos em leite desnatado UAT adicionado em placas de Petri. Esse procedimento foi repetido por cinco vezes, visando à formação completa do biofilme após 10 dias de incubação (Joseph et al., 2001, com adaptações).

3.4.2.1 Enumeração das células bacterianas aderidas

As células bacterianas aderidas aos cupons foram removidas utilizando-se a técnica de esfregação em superfície, empregando-se *swabs* de algodão padronizados, previamente esterilizados. Após o esfregação ser realizado, os *swabs* foram imersos em microtubos contendo 0,9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) esterilizadas. Os microtubos foram agitados em vórtex, por 5 minutos e alíquotas de 0,1 mL foram retiradas da diluição adequada e plaqueadas em TSA, empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas, a 28°C, durante 24 horas.

O número de células aderidas nos cupons foi determinado em intervalos de 48 horas, quando foram retirados 2 cupons sucessivamente, totalizando 10 dias de incubação, visando à formação completa do biofilme e o monitoramento de todas as etapas envolvidas no processo de adesão e formação de biofilme.

3.4.3 Tratamento dos cupons de aço inoxidável com óleos essenciais adicionados em detergente alcalino

Para o teste de sensibilidade das células do biofilme foram utilizados óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris*, nas concentrações de $31 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $62 \mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente, adicionados à solução de 1% de hidróxido de sódio (NaOH).

Após o período de dez dias de cultivo da bactéria, foi realizado o tratamento dos cupons de aço inoxidável contendo o biofilme de *Aeromonas hydrophila*, com as soluções alcalinas adicionadas de óleos essenciais. O controle era realizado com a imersão de cupons em solução alcalina sem adição de óleo essencial. Após a lavagem com água destilada estéril, dois cupons foram destinados à remoção direta das células do biofilme. O tempo de contato entre cupons e diferentes soluções foi de quinze minutos. Foram utilizados dois cupons para imersão em cada solução, totalizando seis cupons para cada temperatura. Após os 15 minutos de exposição dos cupons às diferentes soluções, estes foram rinsados com água destilada estéril e submetidos ao esfregaço com os *swabs*.

Após realização do esfregaço da superfície dos cupons, os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo água peptonada 0,1% (p/v) e agitados em vórtex, por dois minutos. Após este período, diluições seriadas foram realizadas a partir do tubo de ensaio contendo o *swab*, seguindo-se o plaqueamento de alíquotas de $100 \mu\text{L}$ na superfície de TSA, contidos em placas de Petri. As placas foram posteriormente incubadas a 28°C , durante 24 horas.

3.5 Análise estatística

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em que o teste da concentração mínima

inibitória foi constituído de dois tipos de óleos essenciais (capim-limão e tomilho), em diferentes concentrações (0, 4, 8, 16, 31, 62, 125, 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental, por meio do pacote estatístico R (2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo óleo na e j-ésima concentração, com $k = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito do i-ésimo óleo, com $i = 1, 2$;

β_j é o efeito da j-ésima concentração, com $j = 1, \dots, 7$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo óleo e a j-ésima concentração;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Para a proporção de bactérias sobreviventes aos tratamentos com os óleos essenciais, o experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, em que os tratamentos constituíam-se de três tipos de detergente (NaOH, óleo essencial de capim-limão adicionado em NaOH e óleo essencial de tomilho adicionado em NaOH) e duas temperaturas (20°C e 40°C). Foram realizadas contagens de unidades formadoras de colônia UFC / cm^2 , antes e depois da adição do detergente sobre o cupom, expressas na forma logarítmica ($\log \text{UFC} / \text{cm}^2$), sendo a variável medida a razão (proporção) de entre o $\log \text{UFC} / \text{cm}^2$ antes e $\log \text{UFC} / \text{cm}^2$ depois.

A análise estatística foi realizada de acordo com o delineamento experimental por meio do pacote estatístico R Development Core Team (2008). O modelo estatístico que descreve as observações é dado por:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk},$$

em que:

y_{ijk} é o valor da variável dependente na k-ésima repetição que recebeu o i-ésimo detergente na e j-ésima temperatura, com $k = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito do i-ésimo detergente, com $i = 1, 2, 3$;

β_j é o efeito da j-ésima temperatura, com $j = 1, 2$;

$\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i-ésimo detergente e a j-ésima temperatura;

ε_{ijk} é o erro experimental associado à parcela, independente e identicamente distribuído de uma Normal com média zero e variância σ^2 .

Os fatores, quando significativos, foram avaliados pelo teste de Scott-Knott. Embora o fator temperatura seja quantitativo, foi realizado o teste de média, pois havia apenas dois níveis do mesmo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Óleos essenciais

4.1.1 Rendimento

Os teores de óleos essenciais das espécies *C. citratus* e *T. vulgaris* encontrados (Tabela 1) foram comparados com os encontrados na literatura. Pelos dados descritos na Tabela 1, verifica-se que os rendimentos obtidos mostraram-se variáveis em base livre de umidade (BLU).

TABELA 1 Rendimento dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Thymus vulgaris* em base livre de umidade (BLU)

Amostra	Teor (%)	Umidade (%)
<i>Cymbopogon citratus</i> (folhas frescas)	1,07	78
<i>Cymbopogon citratus</i> (folhas secas)	1,46	6
<i>Thymus vulgaris</i> (folhas frescas)	0,37	10
<i>Thymus vulgaris</i> (folhas secas)	0,68	6,6

Observa-se que a espécie *T. vulgaris* proporcionou rendimento médio de 0,37% de óleos essenciais para folhas frescas e 0,68%, para folhas secas. Este valor encontra-se abaixo dos relatados por Jakiemiu (2008) que, trabalhando com plantas secas, obteve valores entre 1,04% a 1,86%. A Farmacopéia

Européia preconiza teor mínimo de 1,5% do óleo, com teor mínimo de 0,5% em fenóis, calculado como timol (Simões, 2004).

O rendimento do óleo essencial de capim-limão teve rendimento médio de 1,07% para folhas frescas e 1,46 para folhas secas. Esses valores estão de acordo com os citados por Carlson et al. (2001), que relataram que o rendimento do óleo essencial de *C. citratus*, em base da matéria seca, situa-se em torno de 0,2% a 2,0%, podendo atingir 3,0%. Silva et al. (2005) encontraram rendimento de 1,06% para o óleo obtido de folhas secas de *C. citratus*. Já Pereira et al. (2008), analisando o rendimento do óleo essencial extraído de folhas frescas dessa planta, obtiveram 2,6%, o dobro do encontrado neste trabalho.

De acordo com Silva et al. (2005), métodos de cortes e de secagens diferentes, após a realização do corte no campo, interferem no rendimento do óleo essencial. Assim, os autores sugerem que o capim-limão deve ser cortado em picadeira manual e colocado sobre lona preta, sobre o solo e seco ao sol, obtendo-se, assim, maior rendimento de óleo.

Guenther (1972) sugere que devido ao alto teor de umidade encontrado nas plantas frescas, há forte tendência à aglutinação do óleo, impedindo que o vapor penetre de forma mais uniforme nos tecidos vegetais.

4.1.2 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

4.1.2.1 *Cymbopogon citratus*

Para o óleo essencial de *C. citratus*, foram encontrados 34 constituintes, tendo os majoritários sido o citral (geranial e neral) e o mirceno, de acordo com a identificação com padrões externos (Tabela 2).

TABELA 2 Compostos majoritários de *Cymbopogon citratus* obtidos por meio de cromatografia gasosa

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração média (%)
3	23,31	Neral	35,41
22	24,79	Geranial	47,03
24	11,18	Mirceno	8,88

Craveiro et al. (1981), avaliando a composição química do óleo essencial dessa planta, identificaram que os compostos citral (mistura isomérica de neral e geranial) são majoritários e responsáveis pelo aroma cítrico da planta. Pereira et al. (2008), por meio da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), encontraram os seguintes constituintes no óleo essencial das folhas frescas de capim-limão: neral 40,2%, geranial 31,8%, mirceno 19,7%, (E)- β -ocimeno 1,4%, (Z)- β -ocimeno 1,1%, neo-mentol 1,1% e acetato de linalila 0,4, confirmando o neral como composto majoritário da planta.

4.1.2.2 *Thymus vulgaris*

Na quantificação do óleo essencial de *T. vulgaris*, obtiveram-se 26 constituintes, sendo o 1,8 cineol e o t-cariofileno os que ocorreram em maior quantidade, de acordo com os padrões externos (Tabela 3). Vários fatores podem influenciar a quantidade e a composição do óleo essencial, tais como clima, tipo de solo, ciclo vegetativo e estágio de desenvolvimento. Assim, a concentração dos constituintes pode variar durante o desenvolvimento do vegetal.

TABELA 3 Compostos majoritários de *Thymus vulgaris* obtidos por meio de cromatografia gasosa

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração média (%)
9	10,11	1,8 cineol	53,46
18	24,10	t-cariofileno	5,44

Hudaib et al. (2002) identificaram que os compostos timol e carvacrol estão presentes como majoritários no óleo essencial da planta de tomilho com dois anos de cultivo, enquanto plantas com cinco anos de cultivo possuíam em sua constituição 1,8-cineol, γ -terpineno, linalol, borneol, timol, β -cariofileno e óxido de cariofileno.

Estudos do óleo essencial de flores e folhas de *T. vulgaris*, que apresentam, assim como o orégano, timol e carvacrol como componentes majoritários, mostraram, por meio de cromatografia gasosa, grande concentração de terpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos. Esses componentes, retirados de diferentes partes do *T. vulgaris*, continham considerável quantidade de flavonoides e vitamina E, compostos de grande interesse na indústria alimentícia por sua atividade antioxidante (Guillén & Manzanos, 1998).

4.2.2 Determinação da concentração mínima inibitória dos óleos essenciais

A técnica de difusão em ágar para determinar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais é, atualmente, a mais utilizada nas pesquisas, já que, por essa metodologia, é possível estudar o grau de inibição do crescimento dos microrganismos. A eficiência do óleo é representada pelo tamanho da zona de inibição formada na superfície do ágar, em volta do disco ou cavidade. (Mondello et al., 2003).

De acordo com Inouye et al. (2006), a atividade de vapor dos óleos essenciais contribui para a formação do halo de inibição. Isso sugere que a difusão em ágar é um método válido na determinação da atividade antimicrobiana, no qual a baixa capacidade de difusão dos óleos, devido à natureza hidrofóbica, é compensada pela elevada volatilidade dos óleos essenciais.

A capacidade dos óleos essenciais em inibir o crescimento de bactérias planctônicas permite a utilização desses compostos como antimicrobianos naturais. Assim, torna-se necessário verificar a CMI, ou seja, a menor concentração em que houve formação de halo, evidenciando inibição da bactéria, por testes *in vitro*, para que o óleo possa também ser eficiente no controle de comunidades complexas formadas pelas bactérias, os biofilmes.

Os halos de inibição induzidos pelos óleos essenciais de *C. citratus* (capim-limão) e *T. vulgaris* (tomilho) foram medidos, mostrando efeito inibitório sobre *A. hydrophila*.

Pelo gráfico da Figura 10 pode-se observar a progressão da formação do halo de inibição de *A. hydrophila* em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais. A partir da CMI do óleo essencial de capim-limão ($31 \mu\text{L.mL}^{-1}$), foi observado halo de inibição.

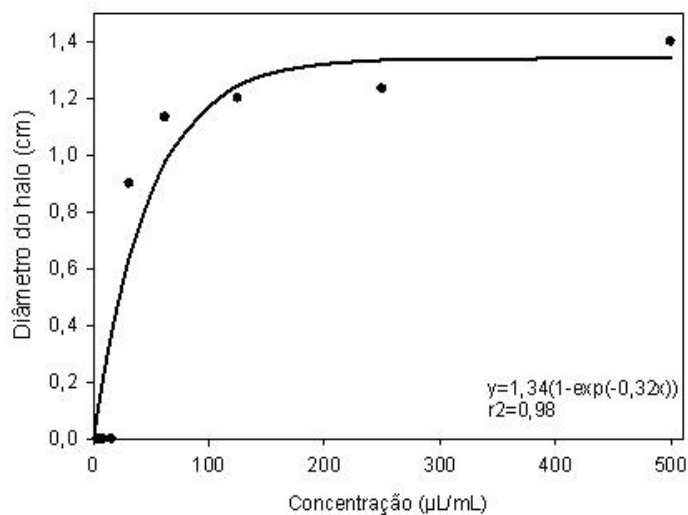


FIGURA 10 Valores observados (•) e estimados (-) do diâmetro de halos de inibição de *Aeromonas hydrophila*, em função das diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Em trabalho desenvolvido por Brugnera (2008), utilizando o óleo essencial de capim-limão extraído a partir de folhas frescas, frente às bactérias *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, observou-se que essas bactérias apresentaram sensibilidade ao óleo essencial, formando halo de inibição nas concentrações de 15,62; 3,90; 3,90 e 3,90 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Pereira et al. (2008) verificaram que o óleo essencial de *C. citratus* promoveu inibição significativa no crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, sendo a CMI de 0,1%, para ambos os microrganismos.

A ação antibacteriana dos terpenos (compostos majoritários do capim-limão) não é completamente compreendida, porém, sabe-se que ela envolve, principalmente, a ruptura da membrana citoplasmática bacteriana devido à natureza lipofílica desses compostos (Cowan, 1999). Essa interação irá resultar

na expansão, no aumento da fluidez e na permeabilidade da membrana celular, na desestruturação das proteínas de membrana, na inibição da respiração celular e em alterações no transporte de íons (Trombetta et al., 2005).

A progressão da formação do halo de inibição de *A. hydrophila* exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais pode ser observada na Figura 11. Observa-se que, para o óleo essencial de tomilho, a CMI foi de $62 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. A partir dessa concentração, houve aumento linear do diâmetro dos halos de inibição, proporcionalmente ao aumento das concentrações, obtendo-se, na concentração de $500 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, maior diâmetro do halo.

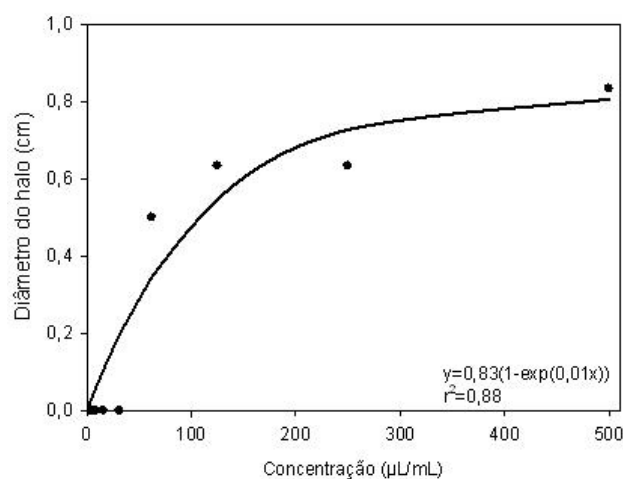


FIGURA 11 Valores observados (•) e estimados (-) do diâmetro de halos de inibição de *Aeromonas hydrophila*, em função das diferentes concentrações do óleo essencial de *Thymus vulgaris*.

Rota et al. (2008), realizando pesquisas com óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Thymus*, entre elas *T. vulgaris*, com o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano dos óleos frente a microrganismos deterioradores de

alimentos, observaram que, entre as bactérias testadas, o maior halo de inibição formado foi observado para *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*. Esta última, assim como *A. hydrophila* é uma bactéria gram-negativa. Viuda-Martos et al. (2008) testaram o efeito inibitório do óleo essencial de tomilho, utilizando a metodologia de disco-difusão em ágar, contra *Staphylococcus xylosum*, *S. carnosus*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter amnigenus*, *Lactobacillus sakei* e *L. curvatus*. Para todas as seis bactérias, a CMI foi de 10%.

Burt & Reinders (2004) trabalharam com o óleo essencial de orégano e observou que os princípios ativos (timol e o carvacrol), que também são compostos majoritários do óleo essencial de tomilho, provocam distorção na estrutura física da célula, causando expansão e conseqüente desestabilidade na membrana, modificando sua permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais e alterando a força próton motora, por meio de variações no pH e potencial elétrico.

As diferenças que ocorrem na atividade biológica entre os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, como a observada entre os óleos essenciais de *C. citratus* e *T. vulgaris*, provavelmente são devido a fatores ecológicos e de crescimento, relacionados à natureza e à concentração de seus constituintes (Chang et al., 2001). Apesar da existência de controle genético, a expressão pode sofrer modificações ambientais resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. De fato, metabólitos secundários representam a interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais (Gobbo-Neto, 2007).

4.2 Biofilme

4.2.1 Adesão das células bacterianas em superfície de aço inoxidável

Utilizando o leite como substrato, houve adesão e formação de biofilme por *Aeromonas hydrophila*, a 28°C, apresentando 4×10^7 UFC/cm² após o quarto dia de cultivo, comparando-se ao inóculo inicial 10^5 UFC.mL⁻¹ (Figura 12). Esses resultados estão de acordo com os de Parizzi (1998) que consideram biofilme quando o número de células aderidas oscila entre 10^6 e 10^7 UFC/cm² e Andrade et al. (1998), que relatam ser necessário o número mínimo de 10^7 células UFC/cm². O crescimento aumentou até o décimo dia de formação do biofilme, porém, manteve-se no mesmo ciclo Log.

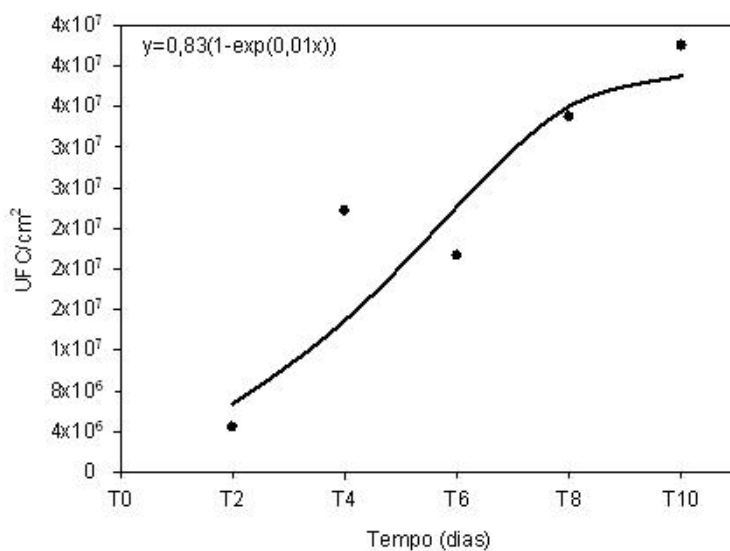


FIGURA 12 Contagem de UFC/cm² de *Aeromonas hydrophila* aderidas em cupons de aço inoxidável AISI 304, ao longo de 10 dias de cultivo, a 28°C.

Aeromonas hydrophila causou alteração no leite, tornando-o de cor amarelada e com odor desagradável. Isso se deve pelo fato de essa bactéria ser degradadora e produtora de lipases (Kirov, 2003).

Boari (2008) estudou a formação de biofilme por *A. hydrophila* em aço inoxidável AISI 304, utilizando também o leite desnatado UAT como substrato, em cultivo por 10 dias. A bactéria formou biofilme em todas as temperaturas analisadas e, para 7° e 18°C, o biofilme já havia sido formado após o segundo dia de cultivo, com contagens de $1,4 \times 10^5$ e $4,7 \times 10^5$ UFC/cm², respectivamente. Para 4°C, foi observado biofilme a partir do quarto dia, com $1,7 \times 10^5$ UFC/cm². Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com os de Wirtanem et al (1996) que consideram biofilme um número de células aderidas de 10^3 e 10^5 por cm².

O crescimento é caracterizado pela taxa de crescimento exponencial (fase log) precedida por um período no qual a maquinaria da célula desenvolve certas mudanças fisiológicas para adaptar-se às condições do meio e desenvolver-se (fase lag). A fase lag é influenciada pela condição inicial da célula, que pode variar dependendo do substrato, do pH, da temperatura, da disponibilidade de nutrientes e de outros fatores. Já a taxa de crescimento depende das condições em que a célula se encontra naquele exato momento.

O consumo do substrato ou aceptores finais de elétrons a uma taxa superior à taxa de reposição pela difusão os torna indisponíveis em parte do biofilme. Por isso, neste experimento, o leite foi repostado a cada 48 horas. A não reposição do substrato fresco pode causar a inibição da atividade metabólica dos microrganismos, devido à limitação de fatores de crescimento.

4.2.3 Tratamento dos cupons de aço inoxidável com óleos essenciais adicionados em detergente alcalino

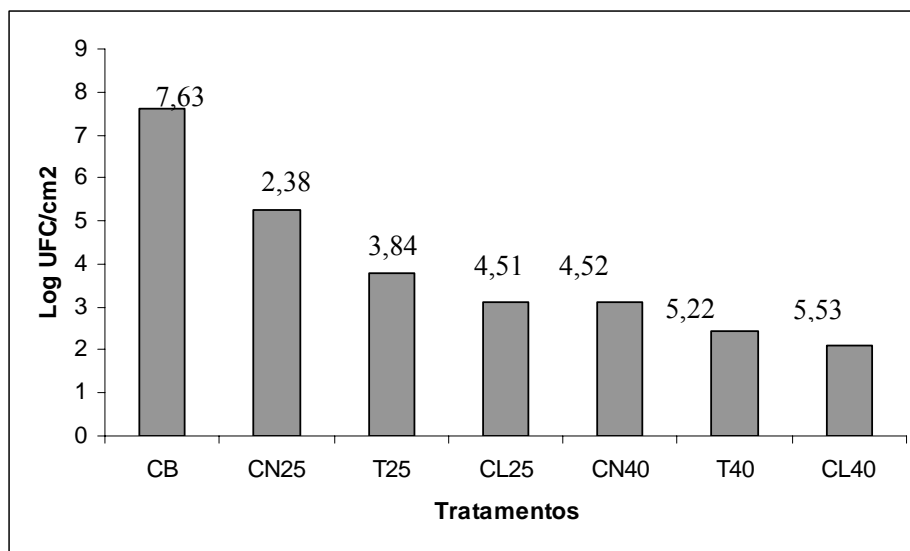
Para a avaliação da eficiência das soluções detergentes sanificantes (óleo essencial e NaOH 1%), foi utilizada a CMI do óleo essencial de tomilho ($62\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) e do óleo de capim-limão ($31\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A eficiência das soluções de óleo essencial de tomilho e NaOH, óleo essencial de capim-limão e NaOH e o controle (NaOH 1%), foi comparada quanto à capacidade de remoção de células sésseis após 10 dias de cultivo, nas temperaturas de 25°C e 40°C das soluções.

Os sanificantes utilizados na indústria, em testes laboratoriais dentro das condições indicadas pelos fabricantes, conseguem ser aprovados em testes como suspensão e diluição de uso, alcançando 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C. Mas, em meios de cultivos, sólidos ou líquidos, não deve haver a formação de glicocálix, fundamental ao processo de adesão (Macêdo, 2004).

Apesar de ainda ser pouco estudado o modo de ação dos óleos essenciais sobre as células microbianas, é possível que, devido à natureza hidrofóbica dos componentes majoritários do óleo essencial de tomilho, ocorra interação com os lipídios da membrana citoplasmática, causando, assim, perda da integridade da membrana e vazamento de material celular intracelular como íons, ATP e ácido nucléico (Helander et al., 1998; Trombetta et al., 2005).

Os óleos essenciais e também o controle de NaOH sem adição de óleo foram eficientes em reduzir a população bacteriana, resultando em menores valores de Log UFC/cm², em comparação com o biofilme sem qualquer tratamento, como pode ser observado na Figura 13.



CB: controle biofilme; CN25: controle NaOH a 25°C; T25: detergente-sanificante tomilho a 25°C; CL25: detergente-sanificante capim-limão a 25°C; CN40: controle NaOH a 40°C; T40: detergente-sanificante tomilho a 40°C; CL 40: detergente-sanificante capim-limão a 40°C

FIGURA 13 Resultados de contagens de *Aeromonas hydrophila* (log UFC/cm²) em cupons de aço sem tratamento e com tratamentos, em diferentes temperaturas de exposição

De acordo com os resultados demonstrados na Figura 13, o biofilme sem qualquer tratamento obteve 7,63 ciclos log UFC/cm². O tratamento com a solução de capim-limão reduziu 4,51 e 5,53 ciclos log presentes no biofilme de *A. hydrophila*, nas temperaturas de 25°C e 40°C, respectivamente. O detergente de tomilho também apresentou redução do biofilme, sendo essa de 3,84 ciclos log, à temperatura de 25°C e 5,22 a 40°C. Quando o biofilme foi tratado com

NaOH (1%) sem adição de óleo, houve redução menor dos ciclos log, sendo essa de 2,38 e 4,52, nas temperaturas de 25°C e 40°C, respectivamente. Houve diferença estatística significativa entre NaOH 1% e os sanificantes com óleos essenciais, mas entre detergente-sanificante de tomilho e de capim-limão não houve diferença. Apesar de não haver diferença estatística significativa entre o sanificante-detergente de tomilho e de capim-limão, a redução em 1 ciclo log, a mais obtida com o sanificante-detergente de capim-limão, é considerada relevante. Tendo em vista as condições do meio, o microrganismo em questão e o seu tempo de geração, essa diferença é importante, pois poderá resultar na contaminação elevada de produtos e transmissão de doenças.

No presente trabalho, não houve interação significativa entre as soluções detergentes-sanificantes, detergente e as temperaturas utilizadas, sendo observada, entretanto, diferença significativa (Tabela 4) entre as soluções detergentes-sanificantes e o detergente (controle), mostrando que os óleos essenciais possuem ação efetiva sobre as bactérias em biofilme. Porém, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com os óleos essenciais de capim-limão e tomilho. A maior proporção de bactérias sobreviventes foi de 56,05% no tratamento em que foi utilizado somente NaOH 1%, mostrando que NaOH, além de possuir atividade de detergente, apresenta capacidade antimicrobiana

TABELA 4 Percentagem de UFC/cm² de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, observada após tratamento dos cupons de aço inoxidável contendo biofilme com soluções detergentes-sanificantes e detergentes

Detergente	UFC/cm ² recuperadas (%)
NaOH (1%)	56,05 A
NaOH (1%) e tomilho	42,33 B
NaOH (1%) e capim-limão	34,67 B

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Apesar de não haver interação entre as soluções e a temperatura, esta influenciou de forma significativa na redução do número de UFC/cm² recuperadas após os tratamentos (Tabela 5). Esse resultado indica que não ocorreu sinergismo entre as soluções sanificantes com a temperatura, sendo a redução obtida a 40°C devido apenas ao aumento da temperatura.

TABELA 5 Percentagem de UFC/cm² de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 observados após tratamento dos cupons de aço inoxidável contendo biofilme com soluções detergentes-sanificantes e detergentes, a temperaturas de 25°C e 40°C

Temperatura	UFC/cm ² recuperadas (%)
25°C	58,47 A
40°C	36,08 B

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

Na literatura, são encontradas poucas pesquisas em que se utiliza aço inoxidável para a formação de biofilme e tratamento com óleos essenciais. Chorianopoulos et al. (2008) testaram desinfetantes químicos ácidos e básicos e também o óleo essencial de *Satureja thymbra* contra biofilmes formados por espécies bacterianas em cupons de aço inoxidável pelo período de 5 dias a 16°C. Os resultados mostraram que o óleo essencial *S. thymbra* apresentou ação antimicrobiana satisfatória contra o biofilme formado por *Salmonella entérica*. Houve redução de 4 ciclos log. Na presente pesquisa, observaram-se resultados semelhantes, tendo o tratamento com as soluções detergentes-sanificantes de tomilho de capim-limão reduzido em 4 ciclos log o biofilme formado por *A. hydrophila*. De acordo com a literatura, esses resultados são satisfatórios considerando células planctônicas. Entretanto, não há um padrão estabelecido de reduções de ciclos log para biofilme.

Lebert et al. (2007) investigaram a eficiência de soluções de timol e eugenol com detergente Brillo, e de óleo essencial de *S. thymbra* frente à biofilme multiespécie formado por bactérias deterioradoras (*P. fragi* e *E. coli*) e patogênicas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*). O detergente Brillo, um sal de amônio quaternário, é um bactericida tradicional utilizado nas unidades de processamento de alimentos da França. Quando utilizado o óleo essencial de *S. thymbra* a 1% e 2%, houve redução das bactérias deterioradoras de 5,1 log para *E. coli* e 5,2 para *L. monocytogenes*, mas, as bactérias patogênicas não foram reduzidas suficientemente: 1,3 log para *S. aureus* e 2,5 log para *L. monocytogenes*. Na combinação de Brillo com timol e eugenol, ocorreu redução na inibição do biofilme. De acordo com os autores, o timol não foi solúvel no Brillo e uma emulsão foi produzida quando eles foram misturados.

CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de capim-limão e de tomilho apresentaram efeito biocida sobre a bactéria estudada.

Os detergentes com capim-limão e tomilho foram mais eficientes na redução do biofilme que somente com NaOH, tendo, na temperatura de 40°C, ocorrido maior redução da população bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.182 p.

ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**. São Paulo, v. 9, n. 53, p. 70-74, jul./ago. 2000.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BRAUN, P.; SUTHERLAND, J. P. Predictive modeling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity of selected Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n.2, p. 257-226, 2005.

BRUGNERA, D. F. **Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas encontradas em alimentos frente a óleos essenciais**. 2008. 73 p. Monografia (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BULHÕES, C. C. C.; ROSSI JUNIOR, O. D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3, p. 320-324, jun. 2002.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 162-167, 2004.

CARLSON, H. G.; MACHADO, R. A. F.; SPRICIGO, C. B.; PEREIRA, L. K.; BOLZAN, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**. New York, v. 21, n. 1, p. 33-39, Sept. 2001.

CARNEIRO, M. S.; ROSSI JUNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* no fluxograma de beneficiamento do leite tipo A e seu comportamento frente à ação de antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 271-276, 2006.

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

CASTRO, O. L.; RAMOS, D. L. R. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, 2003. p. 2-28. (Boletim Técnico, 11).

CHANG, S. T.; CHEN, P. F.; CHANG, S. C. Antibacterial activity of leaf essential oils their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 123-127, Sept. 2001.

CHARACKLIS, W. G. Biofilm development: a process analysis. In: MASCHALL, K. C. (Ed.). **Microbial adhesion and aggregation**. New York: Spreiger Velarg, 1984.

CHARACKLIS, W. G.; W. J. MARSHALL, K. C. **Biofilms**. Newark: J. Wiley, 1990. 316 p.

CHEN, J. M.; ZHANG, Z.; BOTT, T. R. Effects of operating conditions on the adhesive strength of *Pseudomonas fluorescens* biofilm in tubes. **Colloids and Surfaces**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 61-71, June 2005.

CHORIANOPOULOS, N.G.; GIAOURIS, E.D.; SKANDAMIS, P.N.; HAROUTOUNIAN, S.A.; NYCHAS, G.J.E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p.1364-5072, June 2008.

COSTA, L. C. do B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W. PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. 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, dez. 2005.

COSTERTON J.W.; STEWART, P.S. Battling biofilms. **Scientific American**, New York, v.285, p.74-81, July 2001.

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

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 210 p.

CRIADO, M. T.; SUAREZ, B.; FERREROS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Tecnology**, Chicago, v. 8, n. 2, p. 123-126, fev. 1994.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. D.; PEARSON, P.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-t-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, New York , v. 280, n. 5361, p. 295-298, Apr. 1998.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 165-180, Nov. 1987.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 2000. 76 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FIGUEIREDO, R. O. de; 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. 47-49, Nov. 2002.

FLINT, S.H.; BROOKS, J.D.; BREMER, P.J. Properties of the stainless steel substrate, in uencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 43, p. 235–242, 2000.

FRANK, J.F.; CHMIELEWSKI, R. Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. **Journal of Food Protection**, Des Moines v. 64, n. 8, p. 1178–1182, 2001.

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

GUILLEN, M. D.; MANZANOS, M. J. Study of the composition of the different parts of Spanish *Thymus vulgaris* L. plants. **Food Chemistry**, London, v. 63, n. 3, p. 373–383, 1998.

GUENTHER, E. **The essential oils**. Huntington: Krieger, 1972. 227 p.

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

HARRISON, L. L.; TURNER, R. J. CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 981-994, July 2005.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.H; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, Aug. 1998.

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

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; PIETRA, A. M. D.; CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris*) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 691-700, July 2002.

IMPORTADORA DE SEMENTES PARA LAVOURA. **Catálogo**. Porto Alegre, 2001/2002. 74 p.

INOUE, S.; UCHIDA, K.; MARUYAMA, N.; YAMAGUCHI, H.; ABE, S. A. Novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Japanese Journal of Medical Mycology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2006.

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

JAKIEMIU, E.A. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

JASS, J.; WALKER, J. T. **Biofilms and biofouling**. Industrial biofouling – detection, prevention and control. New York, 2000. p. 1-12.

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. M. Update of the genus *Aeromonas*. **ASM News**, Ohio, v. 66, p. 218-223, 2000.

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

KINGSHOTT, J.; WEI, D.; BAGGE-RAVN, N.; GADEGAARD; GRAM, L. Covalent attachment of poly (ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion. **Langmuir**, Washington, v. 19, n. 17, p. 6912-6921, July 2003.

KIROV, S. M. Bactéria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 151-159, 2003.

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

KOUTSOUMANIS, K.; TASSOU, C. C.; TAOUKIS, P. S.; NYCHAS, G. -J. E. Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 981-987, June 1998.

KUMAR G. C.; 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, June1998.

LAI, C. C.; SHIAO, C. C.; LU, G. D.; DING, L. W. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in a burn patient. **Burns**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 255-257, 2007.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LEWINSOHN, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus*(DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, London, v. 81, n. 3, p. 35-39, 1998.

MACÊDO, J. A. B. **Águas & águas**. Belo Horizonte: CRQ, 2004.

MAH, T. F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 1, p. 34-39, jan. 2001.

MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; DEWETTINCK, M. H. K.; BLOCK, J. D. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, p. 514-519, Nov. 2007.

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

MARTINS, R. E.; CASTRO, M. D.; CASTELLANI, C. D.; DIAS, E. J. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220 p.

MEDILANSKI, E.; KAUFMANN, K.; WICK, L. Y.; WANNER, O.; HARMS, H. Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. **Biofouling**, Chur, v. 18, n.3, p. 193-203, 2002.

MARQUES, S. C.; RESENDE, J.G. O. S.; ALVES, L. A. F.; SILVA, B. C.; ABREU, L. R.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on surfaces of stainless steel and glass and its resistance

to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 538-554, 2007.

MASCHIO, J. País despreza suas plantas medicinais. **Folha de São Paulo**. São Paulo, Caderno 6, p.1., Agrofolha, 30 de jun. 1998.

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

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Barking, v. 6, n.1, p. 63-68, Jan./June 2003.

MONDELLO, F.; DE BERNARDIS, F.; GIROLAMO, A.; SALVATORE, G.; CASSONE, A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole – susceptible and – resistant human pathogenic yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1223-1229, Mar 2003.

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

NOTERMANS, S.; DORNMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. **Contribution of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: a review** biofouling, v. 5, p. 1-16, 1991.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHIMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 147-152, Jan. 2005.

OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. P.; ALMEIDA FILHO, E. S.; GONÇALVES, P. M. R. Biofilme na indústria de alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 141, p. 33-35, 2006.

O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews Microbiology**, Palo alto, v. 54, p. 49–79, 2000.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria:

E. coli 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v.43, p. 78-85, jun, 2006.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. 1998. 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; RONALDO, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G.; SALGADO, A. P. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

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

PINTO, J. E. B. P.; LAMEIRA, O. L.; SANTIAGO, E. J. A. DE; SILVA, F. G. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 222 p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing, reference index version 2.8.0. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2008. Software. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

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

RESENDE, J. G. O. S. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Pseudomonas spp.* e seu controle por peróxido de hidrogênio e dicloro isocianurato de sódio**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces

using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, London, v. 61, n. 1, p. 81-85, Oct. 2000.

ROTA, C. M.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A. JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 681–687, 2008.

SACCHETTI G.; MAIETTI, S.; MARIAVITTORIA M.; SCAGLIANTI M.; MANFREDINI S.; RADICE M.; BRUNI R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621–632, ago. 2005.

SALGADO, A. P. S. P. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*).** 2005. 49 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, RS: UFSC, 2004. 1102p.

SANTURIO, J. S.; SANTURIO, D. POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, maio/jun. 2007.

SCHNEIDER P. R. Biofilmes microbianos. **Informativo Sociedade Brasileira de Microbiologia**, v. 1, p. 4-11, out./nov./dez. 2007 .

SHAN, A. Y. K. V. **Constituição química e atividade fungitóxica de extratos de *Thymus vulgaris* L.** 2002. 58p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SHARMA, M.; ANANND, S. K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n.6, p. 627-636, Dec. 2002.

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

SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular Interactions in Biofilms. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 859-871, ago. 2002.

SILLANKORVA, S. M. **Utilização de bacteriófagos no controle de células suspensas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens***. 2004. 155 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Ambientes) – Universidade do Minho, Minho.

SILVA JUNIOR, A. A.; VERONA, M. L. F. **Plantas medicinais e aromáticas**. Itajaí, SC: Ministério de Meio Ambiente/Fundo Nacional do Meio Ambiente, 1997. 456 p.

SILVA JUNIOR, E. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6.ed. São Paulo: Varela, 2005. 623 p.

SILVA, V. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; MUNIZ, F. R.; SALGADO, A. P. S. P.; MORETTO, P.; MALUF, W. R.; SILVA, V. A.; ANDRADE, M. L. Rendimento de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.) submetidos a diferentes métodos de cortes e secagens. **Revista Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 107-153, set./dez. 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, RS: UFSC, 2004. 1102 p.

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

SOUSA, M, R. P. **Higienização de equipamentos de ordenha mecanizada canalizada: diagnóstico de procedimentos tecnológicos**. 2005. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

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

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

SUÑEN, E.; ARISTIMUÑO, C.; FERNANDEZ-GALIAN, B. Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4 C. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 2, p. 111-116, 2003.

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

TEBALDI, V. M. R. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais em *Pseudomonas* sp. e influência dos fatores tempo e temperatura na utilização de solução detergente sanitizante em biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa***. 2008. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico 1997. 317 p.

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

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structure in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 5-6, p. 626-633, June/July 2005.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; LOPEZ, F. J.; ALVARES, J. A. P. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 43, n. 3, 526–531, Mar. 2008.

VON HERTWIG, I. F. **Plantas aromáticas e medicinais**: plantio, colheita, secagem, comercialização. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414 p.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, out./dez. 1998.

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

WOODLING, S.E.; MORARU, C.I. Influence of surface topography on the effectiveness of pulsed light treatment for the inactivation of *Listeria innocua* on stainless-steel surfaces. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, n.7, p.345–351, 2005.

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

ANEXOS

Figura 1 Curva de crescimento de <i>Aeromonas hydrophila</i>	65
Figura 2 Cromatograma <i>Cymbopogon citratus</i>	66
Figura 3 Cromatograma <i>Thymus vulgaris</i>	67
Tabela 1 Resumo da análise de variância para tamanho do halo, segundo os tratamentos estudado.....	68
Tabela 2 Resumo da análise de variância para a variável proporção de bactérias sobreviventes, segundo os tratamentos estudados	69

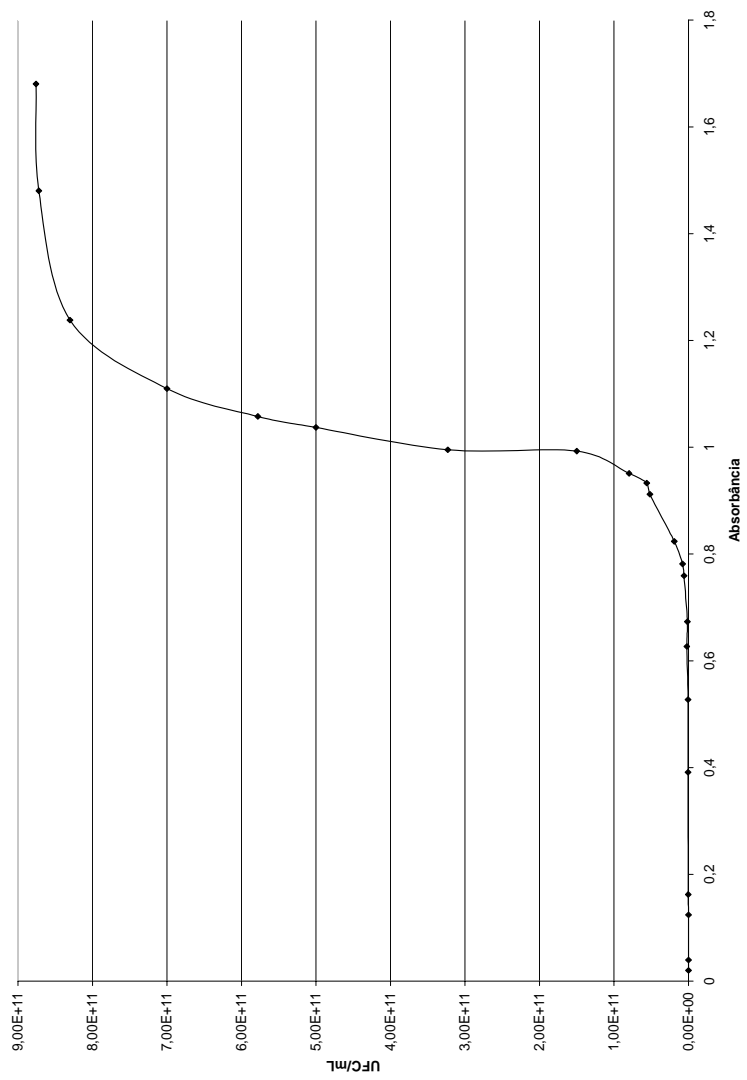


FIGURA 1 Curva de crescimento de *Aeromonas hydrophila*

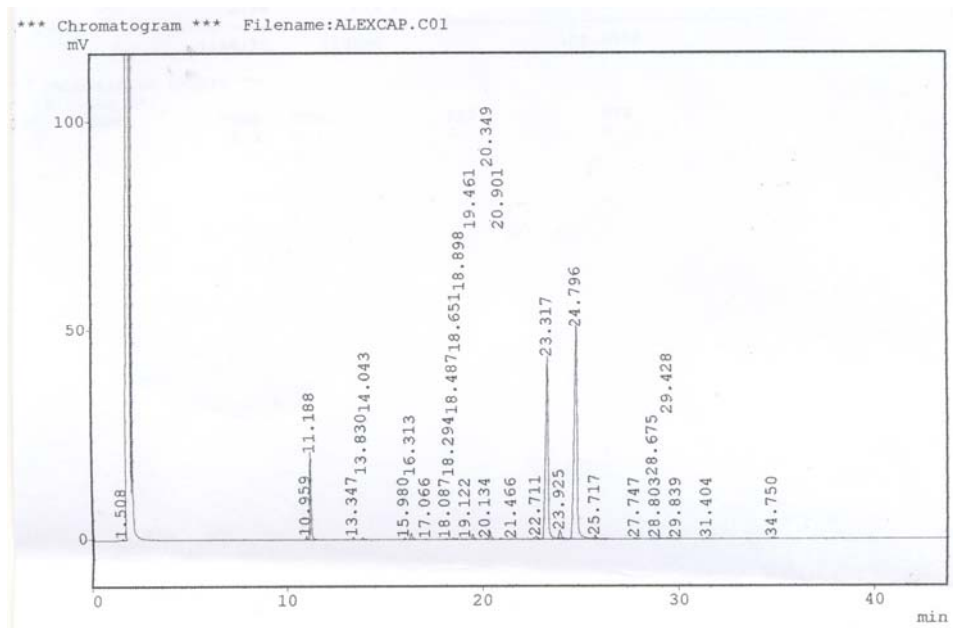


FIGURA 2 Cromatograma *Cymbopogon citratus*

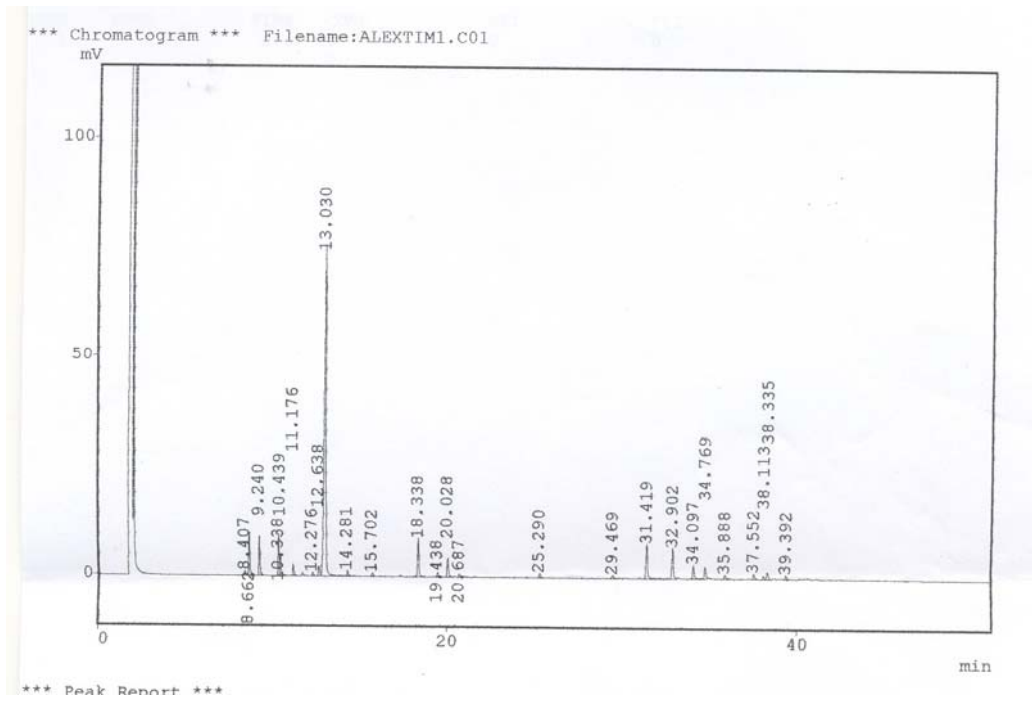


FIGURA 3 Cromatograma *Thymus vulgaris*

TABELA 1 Resumo da análise de variância para tamanho do halo, segundo os tratamentos estudados.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor-p
Oléo (O)	1	2,0008	<0,0001
Concentração (C)	7	1,3608	<0,0001
OxC	8	1,3192	<0,0001
Erro	32	0,0117	
CV (%)		17,08%	

TABELA 2 Resumo da análise de variância para a variável proporção de bactérias sobreviventes, segundo os tratamentos estudados.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor-p
Detergente (D)	2	0,10126	<0,0001
Temperatura (T)	1	0,30058	<0,0001
DxT	2	0,01296	0,1662
Erro	18	0,00653	
CV (%)		17,08%	