

**ANÁLISE E POTENCIAL DE USO DE ÓLEOS
ESSENCIAIS NO CONTROLE DE *Pseudomonas*
sp. E NA FORMAÇÃO DE BIOFILME POR
*Pseudomonas aeruginosa***

VICTOR MAXIMILIANO REIS TEBALDI

2008

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

Tebaldi, Victor Maximiliano Reis.

Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle
Pseudomonas sp. e na formação de biofilmes por
Pseudomonas aeruginosa / Victor Maximiliano Reis Tebaldi. –
Lavras : UFLA, 2008.

94 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Biofilmes. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3. *Pseudomonas
fluorescens*. 4. Óleos essenciais. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 633.88

VICTOR MAXIMILIANO REIS TEBALDI

**ANÁLISE E POTENCIAL DE USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DE *Pseudomonas* sp. E NA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado
em Ciência dos Alimentos, área de concentração
em Microbiologia de Alimentos, para a obtenção do
título de “Doutor”.

Orientadora
Profa. Dra Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL**

2008

VICTOR MAXIMILIANO REIS TEBALDI

**ANÁLISE E POTENCIAL DE USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO
CONTROLE DE *Pseudomonas* sp. E NA FORMAÇÃO DE
BIOFILME POR *Pseudomonas aeruginosa***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso de Doutorado em
Ciência dos Alimentos, área de concentração em
Microbiologia de Alimentos, para a obtenção do título
de “Doutor”.

APROVADA em 31 de outubro de 2008.

Prof. Dr. Geraldo Marcio da Costa	UFLA
Prof. Dr. Eduardo Alves	UFLA
Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Prof. Dr. Alexandre Tourino Mendonça	UNINCOR

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICO

Esta etapa é a realização de mais um ideal. Dedico essa vitória aos meus amados pais, Augusto e Aparecida

AGRADECIMENTOS

Ao Deus da transformação e sabedoria.

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio e amor incondicionais.

A minha amada irmã, Verônica, pela amizade e carinho de sempre.

À Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, orientadora e amiga, pela imensa contribuição em mais essa importante etapa.

À Profa. Maria das Graças Cardoso, pela valiosa co-orientação deste trabalho.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela colaboração.

Aos amigos Thales Oliveira e Rodrigo Araújo, pela colaboração e presteza de sempre.

Aos amigos Vinícius Morais e Elisa Morais, pela colaboração.

Aos amigos Eliane Mara e “Seu” Piano, pela gostosa convivência diária no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA.

Aos colegas Mateus, Diogo, Dieyckson, Elisa, Danila e Suzana, pela contribuição em parte das atividades.

Aos colegas de laboratório (Cleube, Nélio, Carolina, Maíra, Danilo, Alessandra e Simone), pela convivência quase que diária.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica, Rafaela Karin e Luís Gustavo, pela importante ajuda.

Às estagiárias do Laboratório de Química de Orgânica, Sarah, Vanessa, Paula e Stefânia, pela colaboração.

Ao amigos da República Cabaré, pela amizade e companheirismo.

Ao Laboratório de Análises e Sínteses de Agroquímicos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG.

À Capes, pela concessão de bolsa de Doutorado, possibilitando a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Biofilmes: algumas considerações	4
2.2 Definições, diversidade e arquitetura	6
2.3 Mecanismo de adesão e desenvolvimentos bacteriano	9
2.3.1 Superfície condicionante	9
2.3.2 Adesão reversível	10
2.3.3 Adesão irreversível	11
2.3.4 Crescimento da população	12
2.3.5 Estágios finais do desenvolvimento de biofilmes	13
2.4 Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	14
2.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.4.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	15
2.5 Biofilmes na indústria de alimentos.....	16
2.6 Superfícies envolvidas	18
2.7 Higienização na indústria de alimentos	20
2.8 Métodos de erradicação de biofilmes	23
2.9 Substâncias naturais	25
2.9.1 Metabólitos secundários	26
2.9.2 Óleos essenciais	29
2.9.3 Processos de obtenção dos óleos essenciais	33
2.9.4 Processos de extração de óleos essenciais.....	33
2.9.4.1 Enfloração (<i>enfleurage</i>)	34
2.9.4.2 Hidrodestilação.....	34
2.9.4.3 Extração com solventes orgânicos	35
2.9.4.4 Prensagem (ou expressão)	35
2.9.4.5 Extração por CO ₂ supercrítico	36
2.9.5 Descrição botânica e óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>).....	37
2.9.6 Descrição botânica e óleo essencial de sálvia (<i>Salvia officinalis</i>).....	38
2.9.7 Descrição botânica e óleo essencial de cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	39
2.9.8 Descrição botânica e óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Locais e condução do experimento	42
3.2 Óleos essenciais	42
3.2.1 Obtenção dos óleos essenciais	42

3.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais	43
3.3 Microrganismos e preparação dos inóculos	44
3.3.1 Microrganismos utilizados	44
3.3.2 Manutenção da cultura e padronização	44
3.4 Avaliação da concentração inibitória dos óleos essenciais	45
3.5 Formação dos biofilmes em cupons de aço inoxidável	46
3.5.1 Higienização dos cupons	46
3.5.2 Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável	46
3.5.3 Enumeração de células bacterianas sésseis e planctônicas	47
3.5.3.1 Enumeração de células planctônicas	47
3.5.3.2 Técnica do esfregaço para contagem de células sésseis	47
3.5.4 Tratamento dos biofilmes com soluções detergentes sanificantes	47
3.5.5 Determinação do Log Kill	48
3.5.6 Análises estatísticas	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Quantificação e caracterização dos componentes dos óleos essenciais testados	53
4.1.1 <i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-india)	53
4.1.2 <i>Salvia officinalis</i> (sálvia)	53
4.1.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	57
4.1.4 <i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	58
4.2 Atividade biocida de óleos essenciais em <i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
4.3 Formação de biofilmes por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
4.4 Avaliação dos tratamentos empregados para remoção de biofilmes	69
4.4.1 Comparação entre os tratamentos empregados	73
4.4.2 Efeito do binômio tempo x temperatura sobre a exposição de biofilme a soluções detergentes sanificantes	74
5 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

RESUMO

TEBALDI, Victor Maximiliano Reis. **Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle de *Pseudomonas* sp. e na formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*.** 2008. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

Devido aos problemas de resistência a antibióticos e desinfetantes convencionais, a investigação de novos produtos com propriedades biocidas, especialmente os extraídos de vegetais é de grande importância. Avaliou-se a atividade biocida de óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis* sobre *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. Soluções detergentes sanificantes de *S. aromaticum* e *S. officinalis* foram preparadas em NaOH 1%, para a verificação da atividade biocida sobre biofilmes formados por *P. aeruginosa*. A concentração mínima inibitória de cada óleo essencial foi determinada em ágar Müeller-Hinton, empregando-se o método de difusão cavidade ágar. As soluções detergentes sanificante de sálvia e cravo-da-índia foram testadas em biofilmes formados em cupons de aço inoxidável AISI 304, utilizando-se *P. aeruginosa*, padronizada em 10^8 UFC/mL e cultivada, por 10 dias, em 60 mL de leite UHT desnatado. *Pseudomonas fluorescens* não formou biofilme nas condições empregadas. O óleo de *T. vulgaris* apresentou maior efeito inibitório contra *P. fluorescens* (9,4 mm) e *P. aeruginosa* (7,6 mm), seguido por *S. aromaticum* (3,9 mm e 3,2 mm, respectivamente). Os óleos de *S. officinalis* e *R. officinalis* não mostraram atividade biocida contra os microrganismos testados. Melhores resultados na utilização das soluções biocidas sobre biofilmes foram verificados para a

*Comite Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Orientadora), Maria das Graças Cardoso – UFLA

solução de cravo-da-índia, tendo esta se mostrado eficaz em todos os tempos e temperaturas avaliados. A atividade biocida *in vitro* dos óleos essenciais foi demonstrada, assim como a atividade biocida das soluções detergentes sanificante sobre biofilmes formados por *P. aeruginosa*, podendo seu uso constituir mais um importante método de controle deste microrganismo.

ABSTRACT

TEBALDI, Victor Maximiliano Reis. **Analysis and potential use of essential oils in *Pseudomonas* sp. Control and the biofilms formation by *Pseudomonas aeruginosa*.** 2008. 94 p. Thesis (Doctoring in Food Science) – Lavras Federal University, Lavras, MG*.

Due to the resistance problems on antibiotic and conventional disinfectants, the new products research on biocide properties, especially those extracted from vegetables, is of great importance. The essential oils biocide activity of *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* on *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated. Sanitizing detergent solutions of *S. aromaticum* and *S. officinalis* were prepared with NaOH 1% to verify the biocide activity on biofilms formed by *P. aeruginosa*. The minimum inhibitory concentration of essential oil was measured in Müeller-Hinton agar using the cavity diffusion method. The sanitizing detergent solutions of sage and clove were tested in biofilms formed in stainless steel coupons AISI 304, using *Pseudomonas aeruginosa*, standardized in 10^8 CFU/mL cultivated for 10 days in 60 mL of UHT skimmed milk. *Pseudomonas fluorescens* did not form biofilm in the utilized conditions. The *T. vulgaris* oil showed more inhibitory effect against *P. fluorescens* (9,4 mm) and *P. aeruginosa* (7,6 mm) followed by *S. aromaticum* (3,9 mm and 3,2 mm respectively). The *S. officinalis* and *R. officinalis* oil did not show biocide activity against the tested microorganisms. Best results in the use of biocide solutions on biofilms were seen for the solution of clove, and were effective during the periods and the tested temperatures. The biocide activity of the sanitizing detergent solutions was proved on biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa*, so it can contribute to another important control method of this microorganism.

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

1 INTRODUÇÃO

Em condições naturais de crescimento, um microrganismo raramente se encontra em um ambiente tão rico em nutrientes como nos meios de cultura empregados em laboratórios. Em condições adversas, é comum que as células passem da forma planctônica a sésil, uma vez que vantagens, tais como defesa, colonização, comunidade e comportamento coletivo, podem ser observados nesse modo de crescimento.

Os biofilmes consistem de células aderidas a uma superfície, seja ela biótica ou abiótica, embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) secretados para adesão e proteção da célula contra agentes físicos e químicos. Intrincadas relações entre as células podem acontecer em um biofilme, como transferência horizontal de genes; controle da densidade populacional a cargo do sistema *quorum sensing* (QS) por meio de moléculas sinalizadoras, as acil-homoserinas lactonas (AHL); formação de uma trama tridimensional (matriz de EPS) e capacidade de sobrevivência nesta matriz, uma vez que as células experimentam diferentes gradientes de oxigênio nas camadas mais profundas; formação de canais de água; capacidade de tolerância a antibióticos e desinfetantes, dentre outros. Os biofilmes também expressam resistência a determinados antibióticos e sanificantes, sendo essa resistência superior à observada em células planctônicas. Tal resistência pode ser em virtude da produção de estruturas que conferem proteção aos biofilmes, como a matriz de exopolissacarídeos.

A capacidade de adesão de microrganismos em superfícies e equipamentos normalmente utilizados na indústria de alimentos, tem sido freqüente motivo de preocupação, em função das perdas econômicas e malefícios à saúde do consumidor. Uma vez que tais microrganismos encontrem

condições favoráveis ao seu desenvolvimento e nutrientes prontamente disponíveis, podem dar início ao processo de formação de biofilmes pela passagem da forma de vida planctônica à sésil.

Os biofilmes não só representam problema de higienização inadequada na indústria de alimentos, mas também causam prejuízos econômicos por falhas técnicas nos sistemas hídricos, tubulações, tanques de refrigeração, torres de arrefecimento, trocadores de calor e sistemas de cadeia de lubrificação, dentre outros (Meyer, 2003).

Devido aos problemas de resistência a antibióticos e desinfetantes convencionais, a investigação de novos produtos com propriedades biocidas, especialmente os extraídos de vegetais são de grande importância.

Nos dias atuais, com a tendência do mercado de utilizar produtos naturais, destacam-se os agentes antimicrobianos naturais, extraídos de plantas, como os óleos essenciais, também conhecidos por óleos voláteis, etéreos ou essências, obtidos de partes de plantas pela destilação por arraste com vapor de água ou outros métodos. Estes são misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríficas e líquidas, cujas principais características são a volatilidade e o aroma intenso. A utilização de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudada, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (Santos, 2004).

Estima-se que milhares de pessoas tenham problemas com produtos alimentícios contaminados. Desse modo, o uso de aditivos que reduzem ou eliminam a contaminação de alimentos por agentes patogênicos e deterioradores tem possibilitado importantes avanços relacionados à saúde pública.

Muitos esforços são necessários no controle e na erradicação de biofilmes na indústria. Os óleos essenciais podem ser considerados como

alternativa aos aditivos e sanificantes sintéticos, em que seriam adicionados como métodos adicionais no controle de microrganismos patogênicos e deterioradores. Pouco se sabe sobre os efeitos do uso de óleos essenciais como soluções de higienização e os de tais soluções sobre biofilmes. Diante do exposto, objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar a atividade bactericida de óleos essenciais de *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis* sobre *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* e testar, em biofilmes, a eficácia de solução detergente sanificante, resultante da associação entre óleos essenciais e hidróxido de sódio, variando o binômio tempo x temperatura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilmes: algumas considerações

Segundo a teoria da evolução de Darwin, a única verdadeira força motriz por trás do curso de ação de qualquer organismo é a capacidade reprodutiva. Qualquer medida que aumente a proliferação perdurará dentro de uma espécie. Por isso, quando se fala sobre a força motriz por trás da formação de biofilmes, está-se questionando: “De que forma o crescimento na forma sésil promove o crescimento e a sobrevivência da célula?” Parece quase um contra-senso que o crescimento bacteriano na forma sésil possa conferir uma vantagem na capacidade reprodutiva quando se considera que as bactérias na forma de biofilme têm reduzida taxa de crescimento em relação a bactérias que se desenvolvem planctonicamente em meios de cultura (Jefferson, 2004).

Fora do laboratório, no entanto, as bactérias raramente se encontram em um ambiente tão rico em nutrientes como meios de cultura e nessas condições menos ideais há uma série de vantagens, resultantes do modo de crescimento na forma sésil: defesa, colonização (para permanência em um nicho favorável), comunidade e comportamento coletivo (Jefferson, 2004). De acordo com Garret et al. (2008), as vantagens da formação de biofilmes para as bactérias são numerosas. Entre essas, inclui-se proteção contra antibióticos, desinfetantes e ambientes dinâmicos. Comunicações intercelulares dentro de um biofilme estimulam rapidamente o aumento ou a diminuição da regulação da expressão gênica, permitindo adaptação temporal tais como variação fenotípica, bem como a capacidade de sobreviver em condições nutricionais deficientes. Cerca de 99% da população do mundo bacteriano é encontrada na forma de biofilme em diferentes estágios de crescimento e os biofilmes são tão diversos quanto numerosas são as bactérias.

Os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais variados tipos de ambiente, sejam eles bióticos, como tecidos vegetais e animais, ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos. Como já elucidado, a opção por sua constituição está no fato de que estes, por meio da formação de microhabitats, oferecem proteção aos indivíduos que dele fazem parte contra as intempéries e os estresses do meio ambiente (Costerton et al., 1999; Maddula et al., 2006; Johnson, 2007).

As primeiras observações de biofilmes foram realizadas por Antonie van Leeuwenhoek que, investigando amostras de dentes, em seu primitivo microscópio, notou mais fragmentos de células agregadas do que planctônicas. A capacidade das bactérias de formarem complexas comunidades e viver predominantemente em agregados foi estudada desde os tempos de Robert Koch. Porém, a primeira descrição detalhada de adesão microbiana em superfícies foi feita por Zobell, em 1943 e, somente em 1970, a palavra biofilme foi introduzida na literatura científica (Pizzolitto et al., 2001; Costerton & Wilson, 2004).

Na década de 1980, os biofilmes foram amplamente estudados por representarem anomalias e problemas que não podiam ser entendidos utilizando-se o conceito de bactéria como célula planctônica. Enquanto alguns microbiologistas estavam interessados em resolver os problemas e as anomalias nos sistemas naturais e industriais, alguns pesquisadores das áreas médica e odontológica aplicaram os conceitos em seus sistemas de interesse, pois alguns organismos estavam frequentemente envolvidos com a contaminação de aparelhos e infecções bacterianas crônicas (Costerton & Wilson, 2004).

Os biofilmes têm importância em várias atividades, como o uso em estações de tratamentos de águas ou efluentes, removendo organismos patogênicos e reduzindo a quantidade de matéria orgânica; na produção de vinagre e de ácido cítrico; em aplicações farmacêuticas pela produção de

metabólitos secundários e em processos biológicos, para a extração de metais a partir de minério. Em contrapartida, o crescimento indesejável de biofilmes tem impacto negativo em várias atividades, como danos em equipamentos e perdas significativas para a indústria, em âmbito global (Pizzolitto et al., 2001).

Para considerar que células aderidas constituem um biofilme, Andrade et al. (1998) sugerem que seja necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , enquanto Ronner & Wong (1993) e Wirtanen et al. (1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm^2 , respectivamente.

2.2 Definições, diversidade e arquitetura

Desde a sua descoberta, vários conceitos são utilizados para definir biofilmes, sendo alguns deles bastante semelhantes entre si. De acordo com Jessen & Lammert (2003), biofilme consiste em bactérias imobilizadas embebidas em uma matriz de polímeros orgânicos de origem bacteriana. As bactérias secretam polímeros extracelulares para que possam se aderir às superfícies. Biofilmes verdadeiros podem demorar dias ou mesmo semanas para se desenvolver e não são necessariamente uniformes no tempo e espaço.

Oulahal et al. (2007) definem biofilme como um consórcio de bactérias embebidas em uma matriz polimérica fixada em uma superfície imersa. Em indústrias de alimentos, o biofilme, em determinadas condições, pode incluir espécies de microrganismos deterioradores, bem como patogênicos.

Costerton et al. (1999) definem um biofilme como "uma comunidade estruturada de células bacterianas encerradas em uma matriz polimérica e aderente a uma superfície biótica ou abiótica". Elder et al. (1995) descrevem um biofilme, em termos mais cooperativos, como "um consórcio funcional dos microrganismos organizados no âmbito de uma extensa matriz de exopolímeros", enquanto Carpentier & Cerf (1993) simplificam o conceito como

"uma comunidade de microrganismos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderindo a uma superfície".

Basicamente, de acordo com cada uma dessas definições, são três os ingredientes básicos de um biofilme: microrganismos, glicocálix e superfície. Se um desses componentes é removido do mix, um biofilme não se desenvolve. Claramente, esta é uma banalização de um processo bastante complexo que não leva em conta o tipo de microrganismo, a composição da superfície ou as influências de fatores ambientais (Dunne Jr., 2002).

Os biofilmes podem ser formados por apenas uma espécie, sendo, no caso, denominados monoespécie ou por mais de uma espécie de microrganismos, os chamados multiespécies, que são os mais corriqueiramente encontrados na natureza. Segundo Dunne Jr. (2002), quando um biofilme é composto de espécies heterogêneas, os subprodutos metabólicos de um organismo poderiam servir de suporte para o crescimento de outro, enquanto a adesão de uma espécie poderia fornecer ligantes que permitem a adesão de outros. Inversamente, a competição por nutrientes e o acúmulo de substâncias tóxicas e de subprodutos gerados pelos colonizadores primários podem limitar a diversidade das espécies dentro de um biofilme.

As células sésseis podem apresentar alterações fisiológicas devido à sua exposição aos diferentes gradientes das concentrações de oxigênio, nutrientes e resíduos metabólicos. É amplamente reconhecido que essa heterogeneidade química em biofilmes microbianos pode levar os microrganismos a exibirem diferentes taxas de crescimento e atividade metabólica. Até mesmo culturas puras de microrganismos crescendo em biofilmes experimentam destes gradientes e podem existir em um intervalo de estados metabólicos (Werner et al., 2004).

As microcolônias são discretas comunidades de células bacterianas encerradas em uma matriz, que podem incluir células de uma ou várias espécies.

Dependendo da espécie envolvida, as microcolônias podem ser compostas de 10%-25% de células e 75%-90% de matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Células bacterianas no interior da matriz são caracterizadas pela falta de movimento browniano e a análise estrutural de muitas microcolônias freqüentemente revela uma forma semelhante a de um cogumelo (Garret, 2008). O ciclo esquemático de vida de um biofilme monoespécie, adaptado de Jenkison & Lappin-Scott (2001), está ilustrado na Figura 1.

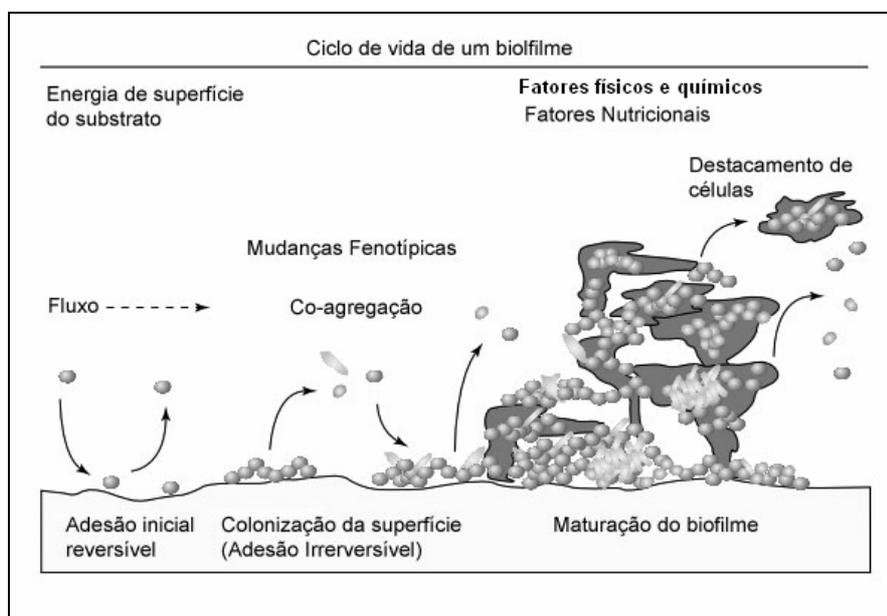


FIGURA 1 Ciclo de desenvolvimento de um biofilme (adaptado de Jenkinson & Lappin-Scott, 2001).

2.3 Mecanismo de adesão e desenvolvimento bacteriano

O crescimento de biofilme é regido por uma série de processos físicos, químicos e biológicos. A aderência de uma célula a um substrato é denominada adesão e a adesão célula-a-célula é denominada coesão. Estes são os mecanismos relacionados às formas de adesão, que determinarão as propriedades adesivas e coesivas que um biofilme exibirá (Garret, 2008).

A adesão das bactérias à superfície é uma das principais etapas do processo de formação do biofilme. Este passo é particularmente afetado pelas características físico-químicas dos microrganismos e dos materiais da superfície envolvida. Vários estudos têm demonstrado a importância da hidrofobicidade da superfície no processo de adesão (Pereira et al., 2000). Essa propriedade representa a molhabilidade de uma superfície e, em meio aquoso, a adesão é favorecida entre superfícies hidrofóbicas, que podem entrar em estreito contato pela compressão da camada de água entre eles (Teixeira, 2005).

2.3.1 Superfície condicionante

O desenvolvimento de camadas adsorvidas, muitas vezes denominadas "condicionante" de uma superfície, é considerado a primeira etapa do processo de formação de biofilmes e tem sido amplamente demonstrado (Barnes, 1999). A camada condicionante é o alicerce sobre o qual um biofilme cresce e pode ser composta de muitas partículas, orgânicas ou inorgânicas. Qualquer substância presente na massa fluida pode, por meio da força gravitacional ou de movimento de fluxo de colônia num substrato, se tornar parte de uma camada condicionante (Garret, 2008), sendo essa capaz de alterar as propriedades físico-químicas do substrato, facilitando acesso às bactérias e, portanto, influenciar na adesão bacteriana. As cargas superficial, potenciais e tensões podem ser alteradas favoravelmente pelas interações entre a camada condicionante e o substrato. O

substrato fornece fixação e nutrientes, aumentando o crescimento da comunidade bacteriana. Uma compreensão dessas interações iniciais é fundamental na identificação de medidas de controle (Barnes, 1999; Garret, 2008).

2.3.2 Adesão reversível

Inicialmente, células microbianas planctônicas são transportadas a partir de granéis líquidos para a superfície condicionada, quer por forças físicas ou por apêndices bacterianos como os flagelos. Uma fração de células alcança a superfície reversivelmente adsorvida. Fatores como energia disponível, funcionalidade da superfície, orientação bacteriana e condições de temperatura e pressão são variáveis ambientais locais que contribuem para a adesão bacteriana. Se as forças repulsivas forem maiores que as forças atrativas, a bactéria se destacará da superfície. Isto é mais provável de ocorrer antes do condicionamento de um substrato (Garret, 2008). Nesta condição, a bactéria pode ser facilmente removida da superfície pela rinsagem (den Aantrekker, 2003).

A energia de ativação para dessorção de bactéria é baixa e, por isso, é provável que ocorra, salientando a fragilidade da ligação. Forças físicas associadas à adesão bacteriana incluem forças de van der Waals, interações estéricas e interações eletrostáticas (dupla camada), coletivamente conhecidas como forças DVLO (relativo a Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek) (Ruter & Vincent, 1980).

A teoria DVLO tem sido utilizada para descrever a rede de interação entre uma célula e uma superfície plana, como um equilíbrio entre dois fatores aditivos, forças de van der Waals (atraentes) e interações de repulsão entre a sobreposição entre a dupla camada elétrica da célula e do substrato (repulsiva

devido às cargas negativas das células) (Hermansson, 1999). Estas são forças de longo alcance, também conhecidas por interações físicas ou fisorção. Uma prolongada teoria DVLO leva em consideração interações hidrofóbica/hidrofílica e osmótica (Chang & Chang, 2002) e também tem sido descrita em termos de interação termodinâmica (Gallardo-Moreno et al., 2002).

2.3.3 Adesão irreversível

O processo de adesão irreversível se dá, inicialmente, pela adesão reversível de células que permanecem imobilizadas. Tem-se argumentado que os apêndices físicos da bactéria (flagelos, fimbria e pili) superam as forças físicas de repulsão da dupla camada elétrica (De Weger et al., 1987). Posteriormente, os apêndices fazem contato com a maior parte da camada condicionante estimulando reações químicas, como oxidação e hidratação (Ganesh & Anand, 1998) e consolidação da bactéria na superfície. Algumas evidências têm mostrado que a adesão microbiana depende fortemente das propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas das superfícies de interação (Liu et al., 2004). No entanto, após um período de indução, as bactérias começam a produzir substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Estes EPS permitem à bactéria ficar firmemente fixadas à superfície, causando uma adesão irreversível. Nesta fase, forças muito mais fortes são necessárias para remover o biofilme (como a raspagem ou esfregação). Durante e após o processo de adesão, as bactérias começam a se multiplicar e o biofilme aumenta em espessura. Como o biofilme amadurece, as células aderidas podem ser destacadas individualmente ou se desfazerem em grandes aglomerados de células no produto em contato com a superfície e, assim, recontaminando o produto (den Aantrekker, 2003).

2.3.4 Crescimento da população

As células, uma vez aderidas, estão fixadas em determinado ponto, onde começam a se dividir, formando microcolônias ocorrendo a disseminação das células filhas para o exterior e o interior do ponto de fixação formando agregados (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002). Normalmente, essas interações e o crescimento dentro do biofilme em desenvolvimento formam uma estrutura semelhante a cogumelo. Acredita-se que a estrutura de cogumelo permita a passagem de nutrientes para as bactérias nas camadas mais profundas dentro de um biofilme. Após uma primeira fase lag, um rápido aumento da população é observado, de outra forma descrita como fase exponencial de crescimento. Isso depende da natureza do ambiente, tanto fisicamente e quimicamente.

O rápido crescimento ocorre à custa dos nutrientes em torno do volume líquido e o substrato. Nesta fase, a contribuição física e química para a adesão inicial termina e os processos biológicos começam a dominar. Excreção do polissacarídeo de adesão intercelular (PAI), polímeros e a presença de cátions bivalentes interagem para formar ligações mais fortes entre as células (Dunne Jr., 2002). Expressão gênica diferencial entre os dois estágios bacterianos (planctônico/séssil) é, em parte, associada a necessidades adesivas da população. Isso pode ocorrer devido à inibição da síntese de apêndices de superfície em espécies sésseis, devido ao fato da motilidade restrita, deixando de ser necessária.

Simultaneamente, a expressão de certo número de genes para a produção de proteínas da superfície celular e excreção de produtos aumenta. As proteínas de superfície (porinas), como Opr C e Opr E, permitem o transporte de produtos extracelulares dentro da célula (Hancock et al., 1990) e a excreção de materiais para fora da célula, por exemplo, polissacarídeos. A estrutura de polissacarídeos de muitas bactérias gram-negativas é relativamente simples, compreendendo tanto homopolissacarídeos como heteropolissacarídeos (Sutherland, 2001). Essas

moléculas transmitem estabilidade mecânica e são essenciais para adesão e coesão do biofilme, e evasão dinâmica de condições ambientais ríspidas. Eles consolidam a estrutura do biofilme. Hall-Stoodley & Stoodley (2002) identificaram as diferenças na expressão gênica de células planctônicas e sésseis e muitas como algumas proteínas associadas a biofilmes (Oliveira et al., 1994) não foram encontradas no perfil planctônico.

2.3.5 Estágios finais do desenvolvimento de biofilmes

A fase estacionária de crescimento descreve uma fase em que a taxa de divisão celular é igual à taxa de morte celular. Em alta concentração de células, uma série de mecanismos de sinalização celular é empregada pelo biofilme e este é coletivamente denominado *quorum sensing* (Bassler, 1999). *Quorum sensing* descreve um processo em que uma série de auto-indutores (sinalizantes químicos e peptídeos em altas concentrações, por exemplo, homoserina lactonas) é utilizada para estimular a expressão genética de ambos os processadores, mecânico e enzimático, de alginato, que constituem parte fundamental da constituição da matriz extracelular.

A fase de morte encara a desagregação do biofilme. As enzimas são produzidas pela própria comunidade que detém a quebra dos polissacarídeos do biofilme em conjunto, liberando ativamente bactérias da superfície para a colonização de substratos frescos. As alginato liases produzidas por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, N-acetil-heparosano liase por *Escherichia coli* e hialuronidase pelo *Streptococcus equi* são exemplos das enzimas utilizadas na quebra da matriz do biofilme (Sutherland, 1999). Simultaneamente, os operons que codificam proteínas flagelares estão sob alta expressão gênica de forma que os organismos tenham os aparatos para motilidade e os genes que codificam para uma série de porinas se mantêm sob

baixa expressão gênica, completando, assim, um ciclo genético para adesão e coesão do biofilme (Garret, 2008).

2.4 Bactérias do gênero *Pseudomonas*

2.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa, aeróbica e ubíqua no ambiente e causa infecções crônicas por biofilmes em indivíduos imunocomprometidos (Bollinger et al., 2001; Costerton et al., 1999). Essas infecções são notoriamente difíceis de se tratar, devido à alta resistência dos biofilmes a antibióticos (Lewis, 2001; Parsek & Singh, 2003).

A superfície celular de bactérias gram-negativas inclui uma membrana externa, apêndices de superfície e, ocasionalmente, proteína extracelular adicional ou camadas capsulares (Ruiz, 2006). A membrana externa é o primeiro componente da célula a entrar em contato com substratos e é diretamente afetada pelas condições de cultivo celular, tais como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes. A compreensão da adaptação da membrana externa bacteriana pode fornecer uma visão sobre a adesão e a utilização de compostos hidrofóbicos (Norman et al., 2002).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, a variação nas moléculas de lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa influencia a hidrofobicidade da superfície celular (Al-Tahhan et al., 2000). A natureza anfipática das moléculas de LPS resulta de três componentes covalentemente ligados, uma região hidrofóbica de lipídeo A, um núcleo oligossacarídeo e uma repetição da porção de um polissacarídeo O (ou antígeno O). A região do antígeno O está em contato com o ambiente circundante e diretamente com impactos não específicos das propriedades da superfície celular, tais como hidrofobicidade. *Pseudomonas aeruginosa* expressa dois tipos distintos de LPS, LPS banda-A e banda-B. O

LPS curto banda-A é composto de 23 unidades repetitivas do trissacarídeo D-ramnose, enquanto o LPS longo banda-A contém numerosos monossacarídeos arranjados como unidades di- a pentassacarídeos (Norman et al., 2002).

No estágio inicial do desenvolvimento do biofilme, *Pseudomonas aeruginosa* usa o flagelo para aderir à superfície e formar monocamada de células. Subseqüentemente, o pili tipo IV permite à bactéria mover-se na superfície, formando microcolônias. Vale ressaltar que, nesse contexto, o pili tipo IV é requerido para gerar translocação na superfície, denominado como *twitching motility* (motilidade de contração). Finalmente, a redução do flagelo e a produção de uma matriz de exopolissacarídeo são necessárias para estabilizar a estrutura tridimensional do biofilme (O'Toole et al., 2000).

Como as células de *Pseudomonas* “sabem” quando estão em condições adequadas para formar um biofilme? Muitas características ambientais são, provavelmente, sentidas, mas a “autoconsciência” da população bacteriana é claramente um elemento chave. O senso da densidade celular bacteriana por *quorum sensing* desencadeia na produção de moléculas sinalizadoras acil-homoserina lactonas (AHL) que se difundem livremente em toda a membrana celular. Em altas densidades de células produtoras de AHL, elevadas são as concentrações de sinalizadores AHL, um ativador transcricional para ligar genes que estão sob condições vantajosas. A *Pseudomonas aeruginosa* tem dois sistemas de *quorum-sensing*, *las* e *rhl*, que usam diferentes AHLs e fatores de transcrição - LasR e RhlR - para controlar diferentes conjuntos de genes envolvidos na patogênese (Stephens, 2002).

2.4.2 *Pseudomonas fluorescens*

Na indústria de alimentos, as pseudomonas, particularmente linhagens psicrotróficas de *P. fluorescens*, são as mais deteriorantes de leite cru, estocados

à temperatura de refrigeração, pois conseguem crescer a 4°C e degradar lipídeos e proteínas que, por sua vez, causam alterações na cor, no sabor e no aroma do leite e derivados. Contudo, como essa bactéria possui dificuldade em crescer a 37°C, raramente é patogênica. No entanto, mesmo assim, pode contaminar sangue e derivados sob refrigeração (Sillankorva, 2004; Kives et al., 2006).

Pseudomonas fluorescens possui tempo de geração curto em temperaturas de refrigeração, o que lhe confere vantagens em relação a outras bactérias gram-negativas. Pesquisas mostram que o tempo de geração de *P. fluorescens* é de 30,2 horas, entre 0°C e 2°C; 6,7 horas, entre 4°C e 6°C e 1,4 hora a 20°C (Ribeiro-Furtini, 2005).

De acordo com Figueiredo (2000), essa bactéria possui várias estratégias para iniciar a adesão a superfícies, sendo dependentes de sinais do meio ambiente. Uma vez que o biofilme esteja formado, *P. fluorescens* pode criar reserva de bactérias e resistir aos sanificantes, podendo, inclusive, contaminar tanques de refrigeração por expansão, quando liberada de um biofilme (Deth & Touch, 2000).

A utilização de substratos, como leite e carne, em estudos de adesão em superfície de aço inoxidável com *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus subtilis*, indicou que essas bactérias são mais resistentes quando formam biofilmes a partir de leite como substrato do que em caldo de carne, sendo os biofilmes formados, em ambos os casos, resistentes à sanificação (Wirtanen et al., 1996).

2.5 Biofilmes na indústria de alimentos

Os biofilmes são preocupação constante em ambientes de processamento de alimentos. Eles não só apresentam risco considerável às condições higiênico-sanitárias da indústria de alimentos, mas também causam prejuízos econômicos

por falhas técnicas nos sistemas hídricos, torres de arrefecimento, trocadores de calor, sistemas de cadeia de lubrificação e similares (Meyer, 2003), tanques de refrigeração (Deth & Touch, 2000), dentre outros.

Partes do biofilme podem se desprender a partir da superfície, o que é motivo de preocupação na indústria de alimentos, devido ao risco de contaminação dos produtos alimentares. O risco se torna ainda mais grave porque bactérias sésseis podem expressar uma maior resistência a desinfetantes (Frank & Koffi, 1990; Mosteller & Bishop, 1993).

Em laticínios e na indústria alimentícia, os biofilmes ocasionam sérios problemas, como o impedimento do fluxo de calor através da superfície devido ao aumento da resistência friccional do fluido na superfície e o aumento da taxa de corrosão na superfície, levando a perdas de energia e de produtos. Por exemplo, nos casos de trocadores de calor, os biofilmes causam aumento da resistência tanto no fluxo de líquidos como na transferência de calor (Criado et al., 1994). Além disso, os biofilmes, incluindo microbiota deterioradora e patogênica, formada sobre superfícies de alimentos como a de aves, outras carnes e superfícies em ambientes de processamento, também oferecem consideráveis problemas de contaminação cruzada e de contaminação pós-processamento (Kumar & Anand, 1998).

Na indústria de laticínios, equipamentos inadequadamente limpos e sanitizados e a microbiota veiculada pelo ar são, usualmente, considerados como as principais fontes de contaminação do leite e produtos lácteos. Os procedimentos *cleaning-in-place* (CIP) são, geralmente, empregados nas linhas de processamento do leite. No entanto, a limitação de procedimentos CIP é o acúmulo de microrganismos sobre as superfícies dos equipamentos, resultando em formação de biofilme. A persistência de microrganismos acumulada na forma de um biofilme pode causar contaminação pós-processamento, levando à redução da vida de prateleira do produto (Zottola, 1994).

Atualmente, sistemas de ordenha automática têm sido cada vez mais utilizados. Os componentes das ordenhadeiras são feitos de borracha, aço inoxidável ou de plástico, que são materiais comuns na indústria de alimentos. Tal como todas as superfícies inertes, estes materiais são sítios potenciais para a formação de biofilmes, mesmo quando programas de higiene e sanificação são corretamente aplicados. Uma vez estabelecido, o biofilme pode agir como uma fonte de contaminação de leite, devido à liberação de microrganismos a partir da superfície para a maior parte do líquido. Tem sido reconhecido que a maior compreensão das interações entre as bactérias e as superfícies pode desempenhar um papel significativo para controlar este problema (Teixeira et al., 2005).

Uma estratégia para prevenir a formação de biofilmes é a desinfecção regular, antes do início da formação de biofilme. No entanto, a fase inicial da formação de biofilme, a adesão de microrganismos à superfície, é um processo bastante rápido e leva apenas algumas horas. É, principalmente, na fase inicial que a adaptação fenotípica é desenvolvida (Meyer, 2003). Em muitos domínios de aplicação, como, por exemplo, na indústria alimentícia, é quase impossível desinfetar com uma frequência suficiente para evitar esta fase inicial. Em sistemas hídricos, a desinfecção regular também pode aumentar a contagem microbiana de células planctônicas na água (Walker et al., 2000). Isso pode ser devido ao aumento do desprendimento de células da superfície ou à maior disponibilidade de nutrientes pela quebra oxidativa de polímeros orgânicos por biocidas (Meyer, 2003).

2.6 Superfícies envolvidas

Vários grupos têm relatado a capacidade das bactérias aderirem a superfícies comumente encontradas em ambientes de processamento de alimentos, tais como a borracha e o aço inoxidável. O aço inoxidável é um

material freqüentemente usado por suas propriedades de resistência à corrosão, tanto no domínio industrial quanto no setor naval (Dagbert et al., 2006).

O aumento da resistência de organismos sésseis a agentes desinfetantes, muitas vezes, agrava os problemas causados pela proliferação microbiana e pode contribuir para a ineficiência do processo *cleaning in place* (Blackman & Frank, 1996). Devido à capacidade da camada condicionante, no estágio inicial de formação do biofilme, alterar as propriedades físico-químicas do substrato e, portanto, influenciar a adesão bacteriana, uma compreensão dessas interações iniciais é fundamental na identificação de medidas de controle. Tem sido demonstrado que uma variedade de proteínas, incluindo as proteínas do leite, afeta a adesão bacteriana a superfícies, tais como poliestireno, hidróxi-apatita, vidro, borracha, aço inoxidável e sílica. A natureza do efeito parece que varia de acordo com o organismo, o substrato e as proteínas sob investigação (Austin & Berferon, 1995; Barnes et al., 1999).

A capacidade de uma superfície de resistir à corrosão é de grande importância, uma vez que depressões provocadas por corrosão podem diminuir acentuadamente a limpabilidade (Flint et al., 2000). Casos de falhas por corrosão, como, por exemplo, devido a divergências do procedimento de desinfecção recomendado, não são incomuns na indústria alimentícia. A resistência à corrosão depende da composição dos materiais, do modo de fabricação, da geometria e do acabamento da superfície. No aço inoxidável passivo, superfícies mais rugosas são mais suscetíveis do que superfícies mais lisas para formas de corrosão localizadas como corrosão alveolar e corrosão de rachaduras. Esse efeito pode ser relacionado com a nucleação da superfície, de uma corrosão alveolar metastável precedendo a propagação alveolar. Embora um número maior de nucleações aconteça em uma superfície mais lisa comparada com a superfície rugosa (Burstein & Vines, 2001), a propagação dos poços e a formação dos micropoços não acontecem imediatamente (Burstein &

Vines, 2001; Zuo et al., 2002). Em uma superfície mais rugosa, várias das nucleações vão levar à propagação de poços acompanhados de corrosão (Hilbert et al., 2003).

O aço inoxidável é um material comumente utilizado na indústria alimentícia. Numerosos trabalhos têm sido publicados tratando da influência de suas características 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; Verran & Boyd, 2001; Boyd et al., 2001; Medilanski et al. 2002; Woodling & Moraru, 2005). Alguns pesquisadores também analisaram o papel qualitativo da molhabilidade da superfície (Leclercq-Perlat & Lalande, 1994; Medilanski et al., 2002; Woodling e Moraru, 2005), mas, em nenhum desses trabalhos, a análise foi estendida para identificar e quantificar uma possível combinação sinérgica ou a influência da rugosidade e da molhabilidade de sujidades, da limpeza e da inativação microbiana. Certamente seria vantajoso conhecer tais influências quantitativamente, pois:

- possibilitaria a separação de influências particulares de rugosidade e molhabilidade;

- proveria uma base clara para requerimentos de especificação com respeito a design higiênico dos aparelhos em questão;

- serviria como guia para futuras pesquisas em topografia e molhabilidade de superfícies de aço inoxidável para a indústria de alimentos (Dürr, 2007).

2.7 Higienização na indústria de alimentos

Segundo Macedo (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 equação abaixo, em que HE significa “higienização eficiente”, mostra a dependência entre os fatores.

$$HE = \text{Energia Química} \times \text{Energia mecânica} \times \text{Energia Térmica} \times \text{Tempo}$$

A energia química se refere às reações de saponificação e de solubilização de proteínas por agentes alcalinos, a dissolução de incrustações minerais por ácidos ou a eliminação de microrganismos por agentes sanificantes, como o cloro ou iodo. A energia química torna-se necessária para a remoção de resíduos aderidos às superfícies, principalmente os insolúveis na água.

A energia mecânica caracteriza o contato eficiente dos agentes de higienização com os resíduos e os microrganismos. Isso pode ser obtido promovendo o contato entre os agentes e as superfícies, como acontece em limpezas manuais, ou imprimindo velocidade às soluções, como ocorre no processo CIP (*clean in place*).

Sabe-se que o calor, energia térmica, tem ação efetiva sobre a eficiência da higienização. Ressalta-se que o nível de temperatura a ser utilizado é limitado pela característica do resíduo a ser removido e pelo processo de higienização a ser utilizado.

Dentro do contexto apresentado, o tempo de contato entre detergente e ou sanificantes com os resíduos é de fundamental importância para que as

reações químicas se processem. Ressalta-se que, nem sempre, quanto maior o tempo de contato mais eficiente será a higienização, pois as reações químicas ocorrem com mais eficiência no início da aplicação dos produtos químicos e, muitas vezes, os resíduos gerados pelas reações mais demoradas levam a um maior custo do procedimento.

Os lipídeos e as proteínas são considerados os principais resíduos aderidos às superfícies, principalmente na indústria laticinista. Para remover os lipídeos, utiliza-se a reação química de saponificação e ou emulsificação e, para retirar as proteínas, altera-se o pH do meio com substâncias alcalinas, pois ele fica acima do PI (ponto isoelétrico).

Outros aspectos de fundamental importância na escolha de um detergente e do procedimento de higienização são a característica da superfície a ser higienizada e o tipo de resíduo a ser retirado.

O aço inoxidável é resistente à corrosão, possui superfície lisa e impermeável, resistente à oxidação e a altas temperaturas.

Não existe nenhuma substância química que apresente todas as funções necessárias para a obtenção de uma higienização adequada. Dentre as substâncias usadas na limpeza de equipamentos e utensílios, encontram-se os fosfatos, os ácidos, os complexantes, os tensoativos e os alcalinos. Este último tem, como funções principais, o deslocamento de resíduos por saponificação e a solubilização de proteínas. Entre os alcalinos, merece destaque o hidróxido de sódio, devido a sua enorme aplicação nas indústrias de alimentos, especialmente a de laticínios.

O hidróxido de sódio, ou soda cáustica, é a substância detergente que apresenta o maior teor de alcalinidade cáustica, apresentando um pH próximo a 13, quando em solução a 1%. Suas características principais são: ótima ação contra gordura e proteínas, baixa ação de molhagem, nenhuma eficácia para eliminar dureza e poder corrosivo muito forte contra alumínio, cobre e

superfícies galvanizadas. Não ataca aço inoxidável. É encontrado comercialmente sob as formas em pó, líquida, escamas, barras e lentilhas. As soluções de hidróxido de sódio são aplicadas quando o procedimento de higienização é automático, em que não há contato com os manipuladores. Têm bastante aplicação em processos de limpeza de trocadores de calor e concentradores de aço inoxidável, principalmente onde se encontram grossas películas de proteínas (Andrade & Macedo, 1996).

Os microrganismos aderidos apresentam resistência maior à ação dos sanificantes (Mosteller & Bishop, 1993; Frank & Kofi, 1990). 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 até 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C. Pesquisas comprovaram que microrganismos aderidos foram entre 150 e 3.000 vezes mais resistentes do que microrganismos não aderidos, à ação do ácido hipocloroso; quando da ação de monoclorinas, foram de 2 a 100 vezes mais resistentes (Le Chevalier et al., 1987).

2.8 Métodos de erradicação de biofilmes

Uma estratégia para prevenir a formação de biofilmes é a desinfecção regular, antes da formação inicial do biofilme. No entanto, a fase inicial da formação de biofilme, a adesão de microrganismos a uma superfície, é um processo bastante rápido e leva apenas algumas horas. É principalmente nesta fase inicial que a adaptação fenotípica é desenvolvida (Das et al., 1998). Em muitos domínios de aplicação, como, por exemplo, na indústria alimentícia, é quase impossível desinfetar freqüentemente o suficiente para evitar esta etapa inicial (Walker et al., 2000).

O controle de biofilmes representa um dos mais persistentes desafios nos ambientes alimentares e industriais onde as comunidades microbianas são problemáticas. Os biofilmes, na indústria de alimentos, podem ser eliminados pela adoção de diferentes estratégias, incluindo métodos físicos e químicos. Além disso, os meios biológicos têm sido a nova dimensão, nos últimos anos, para o biocontrole de biofilmes bacterianos (Kumar, 1998).

Para erradicar ou remover biofilmes, o biocida deve penetrar o EPS e ter acesso à célula microbiana. Devido ao fato de a variação da composição química do EPS variar significativamente de biofilme para biofilme, mecanismos não específicos são preferidos. Substâncias químicas oxidantes, como clorinas ou ácido peracético, são frequentemente utilizadas (Meyer, 2003). Na desinfecção de superfícies abertas, a situação parece ser diferente dos sistemas hídricos. Ácido peracético é relatado como superior ao cloro na erradicação dos biofilmes formados por *Listeria* e *Pseudomonas* em aço inoxidável (Fatemi e Frank, 1999). Enzimas e detergentes também têm sido utilizados como agentes sinérgicos para o aumento da eficácia dos desinfetantes. Várias formulações contendo diferentes enzimas podem ser necessárias para que o processo seja bem sucedido. Basicamente, proteases e enzimas que hidrolisam polissacarídeos podem ser úteis (Meyer 2003).

Métodos físicos para a remoção de biofilmes, como campos elétricos (Blenkinsopp et al., 1992), catalisador modificado de superfícies (Wood et al., 1996, 1998) e ultra-som (Oulahal, et al., 2007; Mott et al., 1998), foram utilizados para reforçar a remoção de biofilme e aumentar a eficácia dos biocidas. Estes sistemas, no entanto, estão limitados a pequenas áreas e ainda não são aplicados na rotina (Meyer, 2003).

2.9 Substâncias naturais

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

Os condimentos são definidos como produtos aromáticos de origem vegetal, utilizados com a finalidade principal de temperar alimentos (FDA, citado por Dziezak, 1989). Os condimentos possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. Pode-se dizer que existem, aproximadamente, 70 tipos de condimentos, cultivados e utilizados em todo o mundo. Apesar de serem cultivados em diversos países tropicais, sua produção em escala comercial restringe-se a poucas regiões do sul e sudeste da Ásia, sendo a Índia o maior exportador (Shelef, 1983). Segundo Phuthi (1980), países como Estados Unidos da América, Singapura e Austrália destacam-se como maiores importadores.

Vários estudos têm evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração do óleo essencial (Parry, 1962; Phuthi, 1980; Farg et al., 1989). Sua obtenção foi aprimorada, na Idade Média, com o advento da destilação, introduzida na Europa pelo povo muçulmano (Tyrrel, 1990).

O mercado de óleos essenciais vem crescendo constantemente, tendo sido notado um aumento de 7,5% entre os anos de 1997 e 2000. Avalia-se a produção brasileira de óleos essenciais em 45 milhões de dólares, o que corresponde a 13,1% da produção mundial. O maior problema da agroindústria produtora de óleos essenciais é a concorrência com similares sintéticos. A indústria que mais necessita dele, a alimentícia, tem substituído os produtos

sintéticos por naturais, em função das exigências de mercado (Silva e Casali, 2000).

2.9.1 Metabólitos secundários

O uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (Barbour et al., 2004; Monthana; Lindequist, 2005).

O metabolismo dos seres vivos origina metabólitos primários e secundários. Enquanto os primários são secretados e essenciais a todos os organismos, os secundários são produzidos apenas por alguns, em sua maioria vegetais, e garantem a essas funções biológicas de perpetuação e defesa (Santos, 2004). Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (Poser & Mentz, 2004).

Os processos metabólicos relacionados às macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) apresentam um elevado grau de similaridade entre os organismos e são denominados metabólitos primários. Vegetais, microrganismos e, em menor escala, animais, entretanto, apresentam arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com elementos de diferenciação e especialização (Santos, 2004). Todo esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais

para o organismo produtor, garantem vantagens para sobrevivência e perpetuação de sua espécie em seu ecossistema (Castro et al, 2004).

A origem de todos estes metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato (Figura 2). O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos aromáticos secundários. O álcool cinâmico, formado por esse caminho, é o constituinte aromático da canela e da pimenta-da-jamaica, sendo transformado em eugenol, principal aroma e elemento pungente do cravo-da-índia (Franco, 2003).

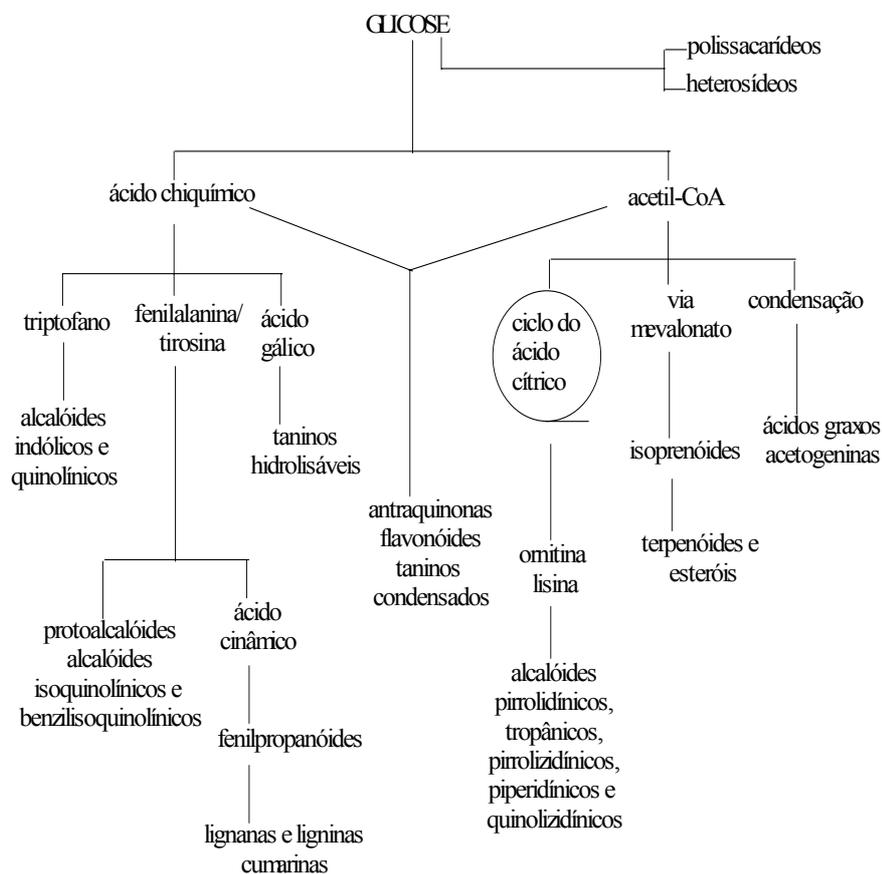


FIGURA 2 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: adaptado de Simões et al. (2004)

Variações temporais e ambientais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas, ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter- e intra-específica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer

modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (Lindroth et al., 1987; Hartmann, 1996). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (Kutchan, 2001).

Os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas. Muitos são de importância comercial, tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (Pereira, 2006).

2.9.2 Óleos essenciais

A *International Standard Organization* (ISO) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor de água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Santos, 2004). Os óleos essenciais dos condimentos são misturas complexas de diferentes compostos, que contribuem para as propriedades antimicrobianas e também dando ao alimento características de sabor e aroma especiais (Aridogam et al., 2002).

Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos, geralmente, de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares, apresentam solubilidade

limitada em água, mas suficiente para aromatizar soluções aquosas, denominadas hidrolatos (Simões et al, 2004).

Os óleos essenciais são, geralmente, isolados de todas as partes das plantas por vários métodos de destilação; o mais comum é a hidrodestilação. Os componentes químicos dos óleos essenciais são representados por várias misturas de terpenóides, especificamente monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅). Embora alguns diterpenos possam estar presentes (C₂₀), outros compostos de baixo peso molecular podem fazer parte da composição química dos óleos essenciais, como hidrocarbonetos alifáticos (linear, ramificados, saturados e insaturados), ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e, excepcionalmente, compostos nitrogenados e sulfurados, cumarinas e homólogos de fenilpropanóides.

Os terpenos, juntamente com os metabólitos aromáticos secundários, são os principais compostos responsáveis pelas atividades medicinais, culinárias e aromáticas das plantas (Dorman, 1999). A maioria dos terpenos tem como precursor o isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 3) e os compostos formados são classificados de acordo com o número de moléculas de isopreno presentes (Santos, 2004). Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos (Ikan, 1991).

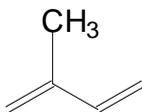


FIGURA 3 Estrutura química do isopreno.

A composição final do óleo essencial é influenciada pelas condições climáticas do local de origem das plantas, além da temperatura de secagem do material vegetal, a qual pode levar a grandes perdas, por volatilização dos princípios ativos presentes nos óleos essenciais (Dorman, 1999).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, sendo, geralmente, específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. Mas, as condições ambientais são capazes de causar variações significativas, como 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 o tipo de cultivo também influenciam a composição química dos óleos essenciais (Willians et al., 1998). A temperatura, a umidade relativa à duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem uma influência direta, sobretudo sobre as espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (Salgado, 2005).

As plantas ricas em óleos essenciais devem ser coletadas pela manhã ou à noite, pois o período de exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante do óleo existente no vegetal. O grau de hidratação do terreno e os teores de macronutrientes (N, P, K) também podem influenciar a composição dos óleos voláteis. Entretanto, não se pode estabelecer um único padrão, pois cada espécie reage de forma diferenciada (Castro, 2006).

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 esquisolísigenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira e bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou, ainda, nas cascas do caules (canelas) e em 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, 1997; Oussalah, 2006).

Biologicamente, os óleos essenciais, por serem voláteis, atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Essa característica torna as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas, sendo largamente estudadas na agricultura por apresentarem atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas (Saito & Scramin, 2000).

Embora a atividade microbiana tenha sido relatada em numerosos trabalhos, poucos estudos têm relacionado o mecanismo de ação destes produtos naturais na célula microbiana. Segundo Conner e Beuchat (1984), os óleos essenciais, provavelmente, danificam vários sistemas enzimáticos, inclusive aqueles envolvidos na produção de energia celular na síntese de compostos estruturais. A presença de óleos essenciais interfere também no mecanismo de reparo necessário para a divisão celular. Sugere-se, ainda, que o tratamento térmico cause danos ou lesões na membrana citoplasmática, permitindo que os componentes antimicrobianos dos óleos migrem mais rapidamente para o interior da célula, alterando o metabolismo normal (Figura 4).

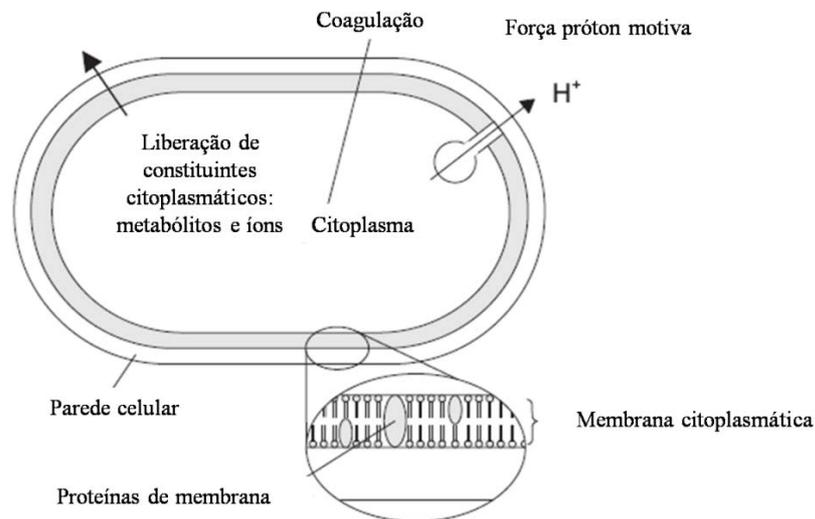


FIGURA 4 Ação dos óleos essenciais na célula bacteriana (adaptado de Burt, 2004).

2.9.3 Processos de obtenção dos óleos essenciais

A labilidade dos constituintes dos óleos voláteis explica por que a composição dos produtos obtidos por arraste de vapor d'água difere da mistura dos constituintes inicialmente presentes nos órgãos secretores do vegetal (Schmaus & Kubeczka, 1985). Durante o processo de destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações (Simões et al., 2004).

2.9.4 Processos de extração de óleos essenciais

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. Os mais comuns estão sumarizados a seguir.

2.9.4.1 Enfloração (*Enfleurage*)

Esse método já foi muito utilizado, mas, atualmente, é empregado apenas por algumas indústrias de perfumes, no caso de algumas plantas com baixo teor de óleo de alto valor comercial. É empregado para extrair óleo volátil de pétalas de flores (de laranjeiras e rosas). As pétalas são depositadas, à temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante certo período. Em seguida, estas pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. Para se obter o óleo volátil, o álcool é destilado à baixa temperatura e o produto assim obtido possui alto valor comercial (Simões et al., 2004).

2.9.4.2 Hidrodestilação

A extração por arraste com vapor de água pode ser considerada a mais simples e segura e, inclusive, a mais antiga, pois é mencionada em textos tão antigos como a Bíblia. Tecnicamente, o processo está ligado à produção de álcool e está baseado no princípio de que a maior parte das substâncias oleosas que se encontram numa matéria vegetal, pode ser arrastada pelo vapor d'água. A destilação por arraste com vapor, empregada para a extração da maioria dos óleos essenciais, é uma destilação de dois líquidos imiscíveis e consiste, em resumo, em uma vaporização a temperaturas inferiores às de ebulição de cada um dos componentes voláteis, por efeito de uma corrente direta de vapor d'água, a qual exerce a dupla função de aquecer a mistura até sua temperatura de ebulição e diminuir a temperatura de ebulição por adicionar pressão de vapor, que se injeta nos componentes voláteis dos óleos essenciais. Os vapores que saem do “pescoço de ganso” se esfriam em um condensador, de onde regressam à fase líquida, os produtos imiscíveis, água e óleo essencial e, finalmente, se separam em um decantador florentino (Baldoni & Czepak, 2008).

Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na₂SO₄ anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas. A Farmacopéia Brasileira IV preconiza o uso de um aparelho tipo Clevenger, com modificações (Simões et al., 2004). Durante a destilação por arraste a vapor, certos componentes do óleo volátil tendem a se hidrolisar enquanto outros são decompostos pela alta temperatura. O método ideal de destilação por arraste a vapor deve possibilitar a maior difusão possível do vapor e da água através das membranas da planta, para que a hidrólise e decomposição sejam mínimas (Robbers et al., 1997).

2.9.4.3 Extração com solventes orgânicos

Os óleos voláteis são extraídos, preferencialmente, com solventes apolares (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos voláteis. Por isso, os produtos assim obtidos raramente têm valor comercial (Simões et al., 2004).

2.9.4.4 Prensagem (ou expressão)

Esse método é empregado para a extração de óleos voláteis de frutos cítricos. Os pericarpos desses frutos são prensados e a camada que contém o óleo volátil é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Simões et al., 2004). De acordo com Baldoni & Czepak (2008), sua aplicação é

conhecida desde o ano de 1776. Rodano classificou em várias etapas os fenômenos que ocorrem durante a extração do óleo, conforme segue:

- a) dilaceração da epiderme e dos tricomas que contêm a essência;
- b) criação, na casca, de áreas com pressão maior que a circundante, através das quais o óleo essencial flui para o exterior;
- c) abrasão da casca, com a formação de pequenas partículas da raspagem. A extração do óleo essencial é realizada sobre a fruta inteira ou sobre a casca e, em ambos os processos, pode ser realizada por um processo manual ou mecânico.

Todos os métodos anteriormente mencionados se baseiam na ruptura das glândulas secretoras de óleo e no recolhimento imediato da essência, para evitar que seja absorvida pelo córtex esponjoso que resulta depois desse tipo de processamento. Por essa razão, todas as máquinas que processam os citros contam com um sistema de aspersão de água que molha constantemente a superfície do fruto (Simões et al., 2004).

2.9.4.5 Extração por CO₂ supercrítico

Esse método permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente óleo volátil, de modo bastante eficiente e, atualmente, é o método de escolha para extração industrial de óleos voláteis. Nenhum traço de solvente permanece no produto obtido, tornando-o mais puro do que aqueles obtidos por outros métodos. Para tal extração, o CO₂ é inicialmente liquefeito por meio de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido.

Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (Simões et al., 2004).

2.9.5 Descrição botânica e óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

O gênero *Thymus* possui numerosa quantidade de espécies e variedades e seus óleos essenciais têm sido estudados (Guillen & Manzanos, 1998; Jordán, Martínez, Cases, & Sotomayor, 2003; Sotomayor, Martínez, García, & Jordán, 2004).

A espécie *Thymus vulgaris* é uma planta semi-arbustiva, de ciclo perene, que atinge até 50 cm de altura. Desenvolve-se formando touceiras com caules lenhosos, rasteiros e tortuosos. As folhas são pequenas, opostas, sésseis, de formato linear-lanceolado ou oblongo e com bordos enrolados para baixo. As flores são pequenas de coloração rosada e branca e agrupadas em inflorescência, em formato tipo espiga. O aroma é herbáceo e o sabor, levemente picante. É amplamente empregada na culinária como condimento (Nagraes, 2003).

É uma planta pertencente à família Lamiaceae, que se adapta aos mais variados climas, porém, os produtos de maior qualidade são obtidos em regiões temperadas quentes, cujas temperaturas variam em torno de 20°C (Silva Junior & Verona, 1997).

Seu óleo essencial é rico em timol, apresentando traços de carvacrol, potentes bactericidas e fungicidas reconhecidos cientificamente (Essawi & Srour, 2000; Reddy et al., 1998). Outros compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, já foram encontrados em extratos da planta, responsáveis pelas atividades antioxidantes, expectorantes, digestivas e antiinflamatórias (Economou et al., 1991; Shan, 2002).

Da espécie *T. vulgaris*, crescida na França e em outros países, seis tipos de substâncias químicas foram relatados: geraniol, linalol, γ -terpineno, carvacrol, timol e 4-terpineol (Piccaglia et al., 1993).

Estudos do óleo essencial de flores e folhas de *T. vulgaris*, que apresentam timol e carvacrol como componentes majoritários, mostraram, por meio de cromatografia em fase gasosa, grande concentração de terpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos. Esses óleos retirados de diferentes partes do *T. vulgaris* mostraram presença considerável de flavonóides e vitamina E, compostos de grande interesse na indústria alimentícia por sua atividade antioxidante (Guillén & Manzanos, 1998). Blum et al. (1997), pesquisando a constituição dos extratos e óleo essencial de *T. vulgaris* por meio da cromatografia de fluido supercrítico, descreveram a presença de timol, carvacrol e p-cimeno como constituintes majoritários.

2.9.6 Descrição botânica e óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis*)

Salvia é um importante gênero, constituído de cerca de 900 espécies da família Lamiaceae. Muitas espécies de sálvia, incluindo *S. officinalis*, foram utilizadas, na tradicional medicina herbárea (Herbalife), contra uma variedade de doenças. Conseqüentemente, extratos de diferentes espécies de sálvia foram estudados para a especificação de suas atividades biológicas, antimicrobianas, antiinflamatórias, antioxidantes, espasmódicas e colinérgicas, envolvendo propriedades e mecanismos parcialmente descritos (Capasso et al., 2004; Ren et al., 2004).

Salvia officinalis L., pertencente à família Lamiaceae, é originária do Mediterrâneo e aclimatada na região Sul do Brasil. É considerada uma planta aromática e com propriedades medicinais, sendo usada como condimento e na medicina doméstica (Martins et al., 1998).

É uma planta herbácea perene, fortemente aromática, ereta ou decumbente, ramificada na base, formando aspecto de touceira, de 30-60 cm de altura, nativa da região Mediterrânea da Europa. Suas folhas são simples, denso-pubescentes, com 3-6 cm de comprimento. As flores são pouco freqüentes em nossas condições, apresentando cor violácea (McHoy & Westland, 1994; Vieira & Albuquerque, 1998).

A sálvia é uma planta medicinal muito popular que há décadas vem sendo estudada, devido aos seus componentes antioxidantes, sendo amplamente usada para tratamentos de vários grupos de doenças, preparação de alimentos, fabricação de cosméticos, perfumes e produtos de higiene (Chipault et al., 1952; Cuvelier et al., 1996).

Seu óleo essencial é obtido, principalmente, das folhas, extraído por hidrodestilação, com rendimento variando de 0,5% a 1,1%. Possui como principais componentes a cis ou trans tujona, cariofileno, 1,8-cineol, α -humuleno e cânfora (Guillen et al., 1996). Os compostos presentes no óleo essencial são biologicamente ativos e possuem ação farmacológica (Duke, 2002).

A ontogenia também afeta a composição do óleo e, em *S. officinalis*, o teor de cânfora aumenta com a expansão da folha (Croteau et al., 1981).

2.9.7 Descrição botânica e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

A espécie *Syzygium aromaticum*, da família Myrtaceae, é uma planta arbórea, perene e atinge 10 metros de altura. A copa é bem verde, de formato piramidal. As folhas são ovais, persistentes e de coloração verde brilhante. As flores brancas são agrupadas em inflorescência do tipo cacho e seus botões são

colhidos quando sua cor muda de verde para carmim, sendo cuidadosamente dessecados ao sol. O fruto é do tipo baga e de formato alongado. Desenvolve-se em clima tropical e a propagação é feita por sementes; prefere solos ricos em matéria orgânica e nutrientes, úmidos e bem drenados (Pereira, 2006). A espécie é nativa das ilhas Moluca e é conhecida no Brasil como craveiro, craveiro-da-índia e cravo (Robbers, 1997; Nagraes, 2003).

Seu óleo, obtido dos botões florais dessecados, é volátil e destilado por hidrodestilação, contendo mais de 85%, por volume, de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70% a 95%), acetato de eugenila e β -cariofileno. É um líquido incolor ou amarelo-claro, classificado como aromatizante, e utilizado nos casos de dispepsia, bronquite e tratamentos dentários (Robbers, 1997). Citam-se, ainda, como componentes fixos, mucilagens, ceras, gomas, resinas, flavonóides, triterpenóides livres e glicosilados, do ácido gálico e da eugenina, um tanino elágico com atividade antiviral contra herpes simples.

Entre os usos do eugenol destaca-se o emprego como anti-séptico em odontologia e na fabricação de dentifrícios, em perfumaria, saboaria e como clarificador em histologia. O eugenol é também usado como matéria-prima para a obtenção de vanilina, empregada na aromatização de doces, chocolates, sorvetes e tabacos (Amorin, 1989).

2.9.8 Descrição botânica e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

Planta de porte semiarbustivo lenhoso, ereto, pouco ramificado, de até 1,5m de altura. Folhas lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3mm de espessura. Flores azulado-claras, pequenas e de aroma forte muito agradável. É nativa da região Mediterrânea e cultivada em quase todos os países de clima temperado. Seu cultivo se dá por meio de mudas preparadas por estaquia ou mergulhia, crescendo bem em solos

ricos em calcário e em ambientes úmidos de clima ameno. Seu uso medicinal é mencionado na literatura etnofarmacológica, que cita o emprego de suas folhas sob a forma de chá (infusão), para medicação dos casos de má digestão, gases no aparelho digestivo, dor de cabeça, dismenorréia e memória fraca (Gruenwald, 2000).

A análise fitoquímica registrou, para suas folhas, a presença de óleo essencial constituído de uma mistura de componentes voláteis, que é responsável pelo seu odor típico. Dentre os principais, têm-se cineol, alfa-pineno e cânfora, e entre os compostos não voláteis, o ácido caféico, diterpenos amargos, flavonóides e triterpenóides (Gruenwald, 2000; Simões, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais e condução do experimento

A extração dos óleos essenciais e a quantificação dos componentes foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

A caracterização dos componentes químicos dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Análises e Sínteses de Agroquímicos, no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, UFV (MG).

A obtenção da curva de crescimento do microrganismo testado, bem como a determinação da atividade biocida por meio das concentrações mínimas inibitórias (CMI), a avaliação da formação e o tratamento dos biofilmes com soluções detergentes sanificante foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Óleos essenciais

3.2.1 Obtenção dos óleos essenciais

Fragmentos constituídos de ramos foliares de *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* e botões florais de *Syzygium aromaticum* foram submetidos à hidrodestilação, utilizando-se aparelho de Clevenger modificado. O material vegetal foi seco em estufa, a 28°C/48 horas. Os frascos para armazenamento dos óleos essenciais foram devidamente higienizados e esterilizados em autoclave, a 121°C, por 15 minutos.

Foram pesados 200g de cada erva utilizada e esta, juntamente com água, foi colocada em balão de fundo redondo e boca esmerilada, deixando-se em

ebulição por um período de 2 a 3 horas. Depois, o hidrolato foi recolhido no decantador do extrator e centrifugado (965,36XG por 5 minutos), obtendo-se o óleo essencial. Este foi coletado com auxílio de micropipeta, pesado e acondicionado em frasco de vidro âmbar e armazenado sob temperatura de refrigeração (Castro, 2006).

3.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Para a avaliação qualitativa dos óleos essenciais, estes foram submetidos à cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), utilizando o aparelho Shimadzu modelo CG-17A, com detector seletivo de massa modelo QP 5000. As condições operacionais foram: coluna capilar de sílica fundida com fase ligada DB5 (30 m X 0,25 mm), gás carreador utilizado hélio a uma vazão de 1 mL/min, temperaturas de 220°C no injetor e 240°C no detector, programação da coluna, temperatura inicial 40°C com acréscimo de 3°C a cada minuto.

Os compostos foram identificados por comparações com espectros existentes na biblioteca (Wiley, 229) e pelo índice Kovat's (Adams, 1995).

Para a avaliação quantitativa foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo 17A, acoplado a um detector de ionização de chama de hidrogênio (FID), coluna capilar DB5. O gás carreador foi o nitrogênio, a uma vazão de 2,2 mL/min, taxa split 1:10 e volume injetado de 1 µL. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220° e 240°C, respectivamente, com pressão da coluna de 115KPa. Foram realizadas três injeções para cada óleo testado, obtendo-se a concentração média e o desvio padrão para cada constituinte, sendo a quantificação obtida por meio de normalização da área.

3.3 Microrganismos e preparação dos inóculos

3.3.1 Microrganismos utilizados

Utilizaram-se *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 e *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, adquiridas da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello, como culturas reveladoras na determinação da atividade biocida e concentrações inibitórias.

3.3.2 Manutenção das culturas e padronização

Durante a realização do experimento, os microrganismos utilizados foram estocados a -18°C , em microtubos contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), NaCl (5g), H_2O (1.000 mL) pH $7,2\pm 7,4$]. Durante o experimento, foram realizadas repicagens para a manutenção das culturas viáveis. Aliquotas foram transferidas dos microtubos para tubos contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas, por 24 horas, a 37°C . Após o cultivo, 1 mL da cultura foi novamente acondicionado em microtubos estéreis e centrifugado, a $6.000 \times g$, durante 8 minutos, em microcentrífuga (Eppendorf). Retirado o sobrenadante, o conteúdo foi novamente recoberto com meio de congelamento e acondicionado sob refrigeração.

Para a padronização das contagens do número de unidades formadoras de colônias, foram elaboradas curvas de crescimento para as culturas de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* utilizadas.

Aliquotas das culturas de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* foram transferidas para Erlenmeyer contendo caldo TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas a 37°C e a 28°C , respectivamente, com a monitoração do crescimento a cada hora, por meio de espectrofotometria (600 nm) e plaqueamento em meio TSA (Tryptic Soy Agar). O procedimento foi repetido até que se chegasse a

leituras com valores constantes, garantindo, assim, a fase estacionária. Este procedimento garantiu o controle do número de unidades formadoras de colônia no inóculo da cultura reveladora.

3.4 Avaliação da concentração inibitória dos óleos essenciais

A metodologia utilizada foi a de difusão cavidade em ágar, empregando-se, para tal, ágar Mueller-Hinton (Mendonça, 2004). Inicialmente, uma fina camada de ágar foi adicionada em placas de Petri (140 mm de diâmetro). Após a solidificação, nove esferas de vidro estéreis com 3mm de diâmetro foram posicionadas sobre o meio sólido. Aliquotas padronizadas de 11,1mL e 7,4 mL de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, respectivamente, foram transferidas para erlenmeyers contendo 200 mL de ágar Mueller-Hinton (45°C), obtendo-se concentração de 10^8 UFC/mL na cultura reveladora. O meio ainda líquido foi então cuidadosamente vertido sobre a camada anterior. Após a solidificação do ágar, as esferas de vidro foram retiradas com auxílio de pinças estéreis, com posterior deposição dos óleos essenciais nos poços formados. As diluições foram realizadas em solução de NaOH (1% p/v) acrescida de solução detergente TWEEN 80 (0,5% v/v), sendo utilizadas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64 e 1:128 partes de solução adicionada de partes de óleos essenciais como diluição, obtendo-se as concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Foram aplicados nos poços 10 μL dos óleos essenciais diluídos. Para cada óleo essencial utilizado realizou-se o controle constituído de solução de NaOH 1%. As placas foram incubadas a 28°C e a 37°C/24 horas, para *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente, e a mensuração dos halos de inibição formados foi realizada com paquímetro. As análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Formação dos biofilmes nos cupons de aço inoxidável

3.5.1 Higienização dos cupons

Foram utilizados cupons de aço inoxidável AISI 304 com 1 mm de espessura e dimensões de 8mm x 18 mm. Estes foram limpos individualmente com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro durante uma 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 duas horas, a 60°C e autoclavados, a 121°C/15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

3.5.2 Formação de biofilmes em cupons de aço inoxidável

Para a formação dos biofilmes em monocultivo de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, 60 mL de leite UHT desnatado foram adicionados em placas de Petri com 140 x 15 mm de dimensão, com subsequente adição de inóculo padronizado contendo 10⁸ UFC/mL. Os cupons de aço inoxidável AISI 304 estéreis foram depositados nas placas com auxílio de pinça estéril, totalizando 30 cupons por placa e, posteriormente, procedeu-se à incubação em agitador orbital horizontal, a 37°C e a 28°C, para *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, respectivamente, com agitação de 50 rpm.

O processo de formação de biofilme foi monitorado durante 10 dias, sendo efetuadas, a cada dois dias, a substituição do meio de cultivo (leite) e das placas de Petri, com retirada de dois cupons para quantificação de células sésseis, bem como a coleta de alíquota de 1 mL de leite contido nos recipientes para enumeração de células planctônicas.

3.5.3 Enumeração de células bacterianas sésseis e planctônicas

3.5.3.1 Enumeração de células planctônicas

Para a enumeração de células planctônicas no meio, alíquotas de 1 mL foram retiradas das placas e transferidas para tubos de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) cada. Em seguida, realizou-se o plaqueamento em ágar TSA, com incubação a 37°C/24 horas.

Para a enumeração de células sésseis empregou-se a técnica do esfregaço com *swab* de algodão estéril, sendo o mesmo passado em toda a superfície do cupom, por meio de movimentos giratórios em um ângulo de 45°.

3.5.3.2 Técnica do esfregaço para contagem de células sésseis

Para enumerar as células sésseis, durante 10 dias de incubação, foram retirados, a cada dois dias, dois cupons de cada placa de Petri. Os cupons foram lavados em água peptonada 0,1% (p/v) em placas de Petri 90 x 15 mm, empregando-se três lavagens sucessivas para a remoção de células não aderidas. As células sésseis foram removidas utilizando-se *swab* de algodão. Os *swabs* foram imersos em tubos contendo 10 mL de água peptonada 0,1% (p/v), seguido de agitação em vórtex por 2 minutos. Em seguida, retirou-se alíquota de 1 mL, com posterior transferência para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v), sendo realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}), com posterior plaqueamento em meio TSA, seguido de incubação a 37°C/24 horas.

3.5.4 Tratamento dos biofilmes com soluções detergentes sanificante

Ao décimo dia de cultivo dos biofilmes foram testados, sobre células sésseis, os efeitos biocidas de soluções detergentes sanificante preparadas com óleos essenciais de cravo-da-índia e sálvia diluídos em NaOH 1% (p/v) contendo

Tween 80 (0,5% v/v). Os cupons foram retirados das placas contendo o meio, sendo realizadas três lavagens sucessivas em água peptonada, visando à remoção de células não aderidas. Após lavagem, os cupons foram imersos em placas de Petri 49 x 13 mm contendo soluções detergentes sanificantes, na proporção uma parte de óleo essencial para 8 partes de solução de hidróxido de sódio (1:8) e em apenas solução de hidróxido de sódio (1%) + Tween 80 (0,5%) (grupo controle), variando tempo x temperatura de exposição, que foram os seguintes: 15 minutos/15°C, 15 minutos/45°C, 60 minutos/15°C e 60 minutos/45°C.

Após exposição da população aderida nos cupons aos tratamentos com soluções de óleos essenciais, realizaram-se o enxágue em água destilada estéril (três lavagens sucessivas) e esfregaço com *swabs*, com posterior diluição seriada e plaqueamento em ágar TSA, com incubação a 37°C para enumeração de células viáveis em ágar TSA, conforme técnica descrita anteriormente.

3.5.5 Determinação do Log Kill

Após tratamento com as soluções detergentes sanificante, foi determinado o Log kill, de acordo com Sharma et al. (2002), para cada tratamento empregado, por meio da seguinte equação:

$$\mathbf{Log\ Kill = Log\ N - Log\ n,}$$

em que *N* é a contagem de células de controle não tratado e *n* é a contagem de células após tratamento com soluções detergentes sanificantes.

3.5.6 Análises estatísticas

Para a determinação da atividade biocida de óleos essenciais em *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*, o experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três

repetições. Os tratamentos constituíram-se de quatro diferentes óleos essenciais (cravo-da-índia, tomilho, sálvia e alecrim + controle) em diferentes concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{L/mL}$). Os valores de diâmetros (mm) dos halos de inibição foram mensurados. Os óleos essenciais de sálvia e alecrim e o controle (NaOH 1%) foram retirados das análises, pois os mesmos não apresentaram nenhum efeito inibitório (ausência de halo).

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 avaliação da população planctônica e séssil, o experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições em que foram enumeradas as populações de bactérias ao longo dos dias (2, 4, 6, 8 e 10). O experimento foi realizado em duas condições de crescimento (formas séssil e planctônica). Para avaliar o crescimento da

população, foi ajustada uma curva de crescimento de acordo com o modelo logístico:

$$y = \frac{a}{1 + b \exp(-kt)}$$

em que:

y é o tamanho da população no tempo t

a é o tamanho máximo da população

k é taxa de crescimento da população

b é um parâmetro de inflexão sem interpretação biológica.

A avaliação da eficácia das soluções detergentes sanificante sobre biofilmes foi instalada segundo um delineamento inteiramente casualizado com três repetições em que os tratamentos eram constituídos de três tipos de solução (controle, cravo-da-índia e sálvia), duas temperaturas (15°C e 45°C) e dois tempos (15 e 60 minutos). Foram realizadas contagens de UFC/cm², antes e depois da adição das soluções, expressas na forma logarítmica (Log UFC), sendo a variável medida a razão dados por:

$$y = \log(UFC \text{ Inicial}) - \log(UFC \text{ Final})$$

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:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_k + \alpha\beta_{ij} + \beta\delta_{jk} + \alpha\delta_{ik} + \alpha\beta\delta_{ijk} + \varepsilon_{ijkl},$$

em que:

y_{ijkl} é o valor da variável dependente na l-ésima repetição que recebeu o i-ésima solução, na j-ésima temperatura e no k-ésimo tempo, com $l = 1, \dots, r$;

μ é uma constante inerente a cada observação;

α_i é o efeito da i-ésima solução, com $i = 1, 2, 3$;

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

δ_k é o efeito do k-ésimo tempo, com $k=1,2$;

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

$\beta\delta_{jk}$ é o efeito da interação entre j-ésima temperatura e o k-ésimo tempo;

$\alpha\delta_{ik}$ é o efeito da interação entre a i-ésima solução e o k-ésimo tempo;

$\alpha\beta\delta_{ijk}$ é o efeito da interação entre a i-ésima solução, a j-ésima temperatura e o k-ésimo tempo;

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. Apesar de os fatores temperatura e tempo serem quantitativos, foram realizados teste de média, pois havia apenas dois níveis dos mesmos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração dos óleos essenciais, foram calculadas as percentagens de umidade na matéria vegetal seca e também o rendimento de óleo essencial. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 1.

TABELA 1 Percentagem de umidade e rendimento de óleo essencial após hidrodestilação

Vegetal	X Umidade (%)	X Óleo essencial (%)
Sálvia	2,44	1,47
Tomilho	6,6	0,37
Cravo-da-índia	2,43	0,72
Alecrim	2,37	1,85

O rendimento do óleo essencial de sálvia foi ligeiramente superior aos citados por Guillen et al. (1996). De acordo com esses autores, o óleo essencial de sálvia, obtido principalmente das folhas, extraído por arraste de vapor, tem rendimento variando de 0,5% a 1,1%.

De acordo com os dados descritos na Tabela 1, observa-se que a espécie *Thymus vulgaris* proporcionou um rendimento médio de 0,37% de óleos essenciais. Este valor encontra-se abaixo daqueles relatados por Jakiemiu (2008) que, trabalhando com plantas secas, obteve valores situados entre 1,04% a 1,86%, por períodos de uma a três horas de extração, respectivamente.

4.1 Quantificação e caracterização dos componentes dos óleos essenciais testados

4.1.1 *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia)

A caracterização do óleo essencial de *S. aromaticum* apresentou em sua composição, como componentes majoritários (Figura 5), eugenol (89,80%), trans-cariofileno (5,86%) e α -humuleno (2,30%), conforme os dados da Tabela 2.

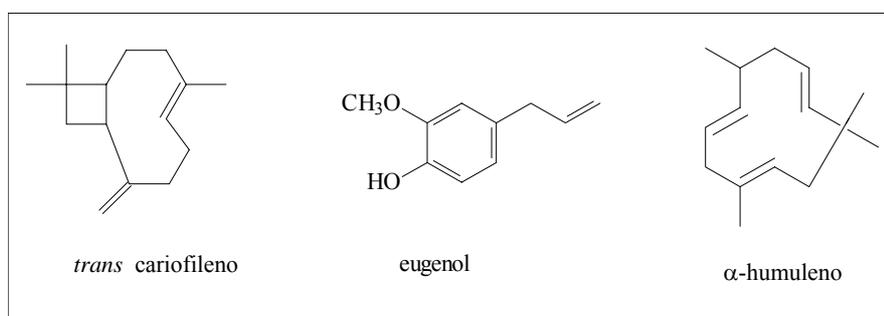


FIGURA 5 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Syzygium aromaticum*

Oussalah et al. (2006) avaliaram a constituição do óleo essencial de cravo-da-índia e encontraram proporções de 78% para eugenol, valor próximo ao obtido pela avaliação realizada.

4.1.2 *Salvia officinalis* (sálvia)

Para a espécie vegetal *S. officinalis*, foram encontrados, como componentes majoritários, 1,8 cineol (15,42%), trans tujona (5,94%), cis tujona

(26,69%) e canfeno (6,81%) (Figura 6), além de concentrações expressivas de cânfora (30,46%), de acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.

TABELA 2 Componentes químicos do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* encontrados

Óleo essencial de <i>Syzygium aromaticum</i>					
Pico	TR	IKcal	IKtab	CM±D	Composto
1	12,66	-	-	2,02±0,57	n.i
2	28,77	1354	1356	89,80±0,72	eugenol
3	31,23	1417	1418	5,86±0,18	trans-cariofileno
4	35,80	1453	1454	2,30±0,08	α-humuleno

TR= tempo de retenção, IKcal = índice Kovat's calculado, IKtab = índice Kovat's tabelado (Adams, 1995), CM (%) ±DP = concentração média (%) ± desvio padrão da média, obtido de três repetições de injeção do óleo essencial no CG-FID e N.I. = composto não identificado

TABELA 3 Componentes químicos do óleo essencial de *Salvia officinalis* encontrados

Óleo essencial de <i>Salvia officinalis</i>					
Pico	TR	IKcal	IKtab	MC±D	Composto
2	8,43	933	939	3,35±0,14	α-pineno
3	9,03	948	953	6,81±0,35	Canfeno
4	10,22	974	980	0,86±0,05	β-pineno
5	12,79	1029	1033	15,42±0,37	1,8 cineol
6	16,58	1100	1102	26,69±0,19	cis tujona
7	16,97	1110	1114	5,94±0,05	trans tujona
8	18,37	1141	1143	30,46±0,57	Cânfora
9	19,42	1164	1165	4,05±0,04	Borneol
10	25,10	1283	1285	1,40±0,02	acetato de bornila
11	30,98	1413	1418	0,57±0,00	trans cariofileno
12	32,56	1451	1454	0,74±0,04	α-humuleno
13	38,50	1594	1590	1,19±0,07	veridiflorol

TR= tempo de retenção, IKcal = índice Kovat's calculado, IKtab = índice Kovat's tabelado (Adams, 1995), CM (%) ± DP = concentração média (%) ± desvio padrão da média, obtidos de três repetições de injeção do óleo essencial no CG-FID e N.I. = composto não identificado

4.1.3 *Rosmarinus officinalis* (alecrim)

Na Tabela 4 são apresentados os componentes identificados no óleo essencial de *R. officinalis* com concentrações superiores a 1%. Os constituintes encontrados em maiores proporções (Figura 7) foram 1,8 cineol (47%), α -pineno (14,3%) e cânfora (14,36%), além dos compostos em concentrações menores, como canfeno, 4-terpineol, verbenone, β -pineno e borneol. Bauer et al. (1997) descreveram, como componentes majoritários do óleo de *R. officinalis*, α -pineno, 1,8 cineol e cânfora, confirmando os valores encontrados neste trabalho.

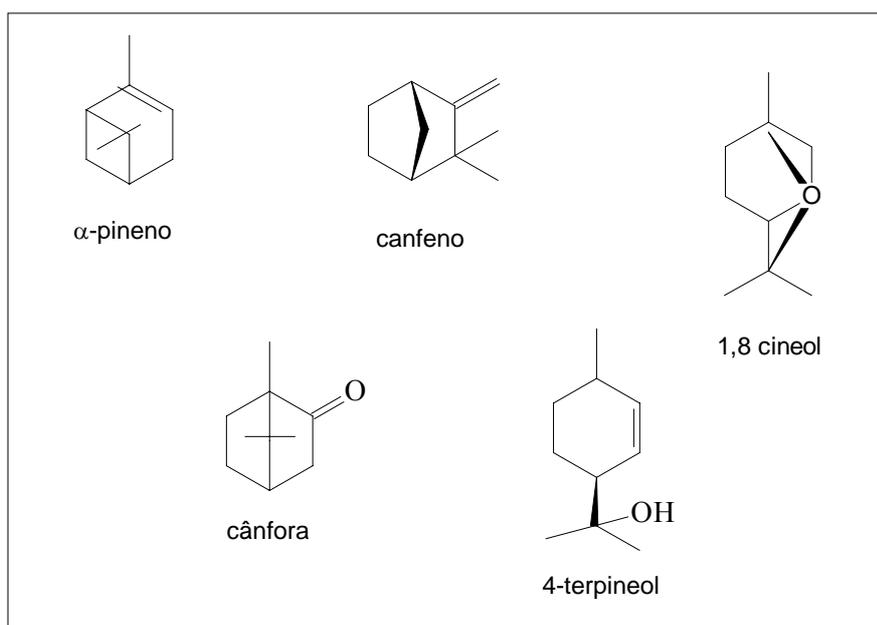


FIGURA 7 Componentes majoritários do óleo essencial de alecrim.

Atti-Santos et al. (2005) encontraram, como componentes do óleo essencial de *R. officinalis*, α - pineno (40,55% a 45,10%), 1,8-cineol (17,40% a 19,35%), canfeno (4,73% a 6,06%), verbenona (2,32% a 3,86%) e borneol (2,24% a 3,10%). Variações significantes na composição química do óleo foram relatadas em relação à região geográfica de origem, hora da colheita, condições fisiológicas dos ramos e folhas, equipamentos utilizados na destilação e controle do processo (Dellacassa et al., 1999). Segundo Tewari & Virmani (1987), todos estes parâmetros, possivelmente, desempenham papel importante na composição do óleo.

4.1.4 *Thymus vulgaris* (tomilho)

A avaliação qualitativa e quantitativa do óleo essencial de *T. vulgaris* identificou o timol na concentração de 47,69%, corroborando com a maioria dos valores encontrados nas demais pesquisas, as quais citam este componente como majoritário. Alguns dos componentes majoritários podem ser visualizados na Figura 8. Blum et al. (1997), pesquisando a constituição dos extratos e óleo essencial de *T. vulgaris* por meio da extração por CO₂ supercrítico, descreveram a presença de timol, carvacrol e p-cimeno, como constituintes majoritários.

TABELA 4 Componentes químicos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* encontrados

Óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>					
Pico	TR	IKcal	IKtab	CM±D	Composto
1	8,43	936	939	14,36±0,04	α-pineno
2	8,99	949	953	4,88±0,00	canfeno
3	10,21	976	980	3,34±0,00	β-pineno
4	10,83	-	-	1,37±0,02	n.i
5	12,28	-	-	1,78±0,00	n.i
6	12,82	1031	1033	47,00±0,12	1,8 cineol
7	18,35	1142	1143	14,31±0,11	canfora
8	19,42	1163	1165	1,03±0,01	borneol
9	20,06	1176	1177	4,83±0,03	4-terpineol
10	21,54	1202	1204	0,41±0,00	verbenona
11	25,05	1282	1285	0,23±0,00	Acetato de bornila
12	31,00	1415	1418	0,78±0,01	Trans-cariofileno

TR = tempo de retenção, IKcal = índice Kovat's calculado, IKtab = índice Kovat's tabelado (Adams, 1995), CM (%) ± DP = concentração média (%) ± desvio padrão da média, obtidos de três repetições de injeção do óleo essencial no CG-FID e N.I. = composto não identificado

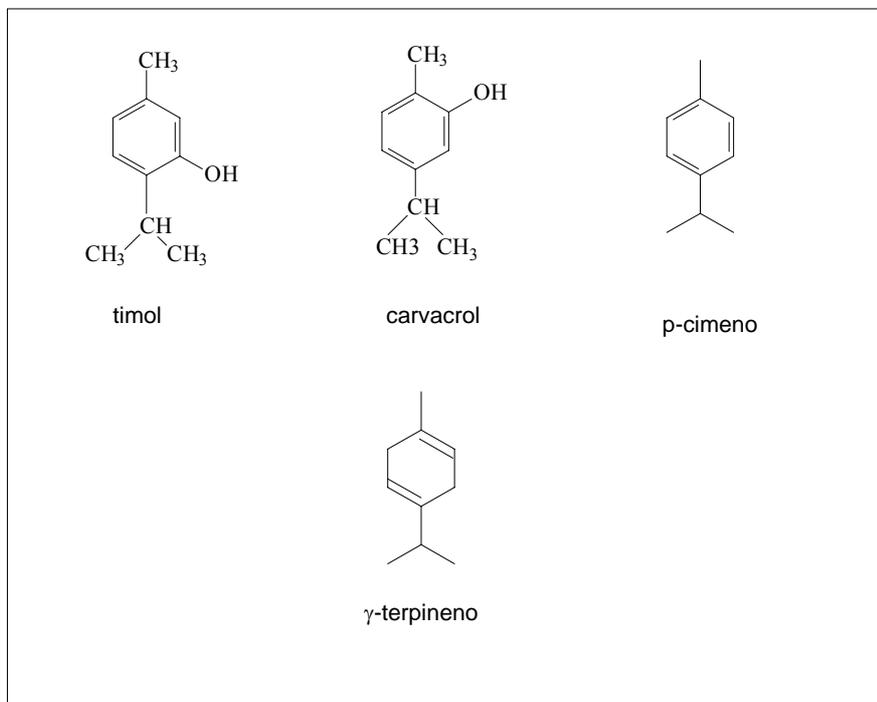


FIGURA 8 Componentes majoritários do óleo essencial de tomilho.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, foram identificados para-cimeno, γ -terpineno e carvacrol como componentes majoritários. Sartoratto et al. (2004), analisando o óleo de tomilho, identificaram, como componentes majoritários, timol (79,15%), carvacrol (4,63%) e para-cimeno (3,27%), estando, portanto, de acordo com os encontrados neste trabalho.

4.2 Atividade biocida de óleos essenciais em *Pseudomonas fluorescens* e

Pseudomonas aeruginosa

Os óleos essenciais de *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* e também o controle (NaOH 1%) não apresentaram atividade biocida sobre as linhagens bacterianas testadas, não tendo sido identificado nenhum halo inibitório durante a realização do experimento.

Em estudo no qual relacionaram o efeito da sálvia no crescimento de bactérias enteropatogênicas e deterioradoras, em alimentos em caldo nutriente, Shelef et al. (1983) demonstraram que *Bacillus cereus* foi menos resistente ao condimento, seguido por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* sp. e *Salmonella thyphimurium*. Este estudo concluiu que a sálvia foi mais eficiente contra bactérias gram-positivas, sendo seu efeito antimicrobiano mais acentuado em caldo nutriente que em alimentos, devido aos compostos nutrientes do alimento que protegem a célula microbiana do efeito deletério do composto.

A atividade antimicrobiana do óleo de sálvia, assim como a maioria dos óleos essenciais, é mais pronunciada em bactérias gram-positivas que em gram-negativas. Esta resistência de microrganismos gram-negativos pode ser atribuída à presença de sua membrana fosfolipídica externa, quase impermeável a componentes lipofílicos (Nikaido & Vaara, 1985). A ausência desta barreira em bactérias gram-positivas permite o contato direto dos constituintes hidrofóbicos do óleo com a bicamada fosfolipídica da membrana celular, provocando, como efeitos, o aumento da permeabilidade iônica e a fuga de constituintes intracelulares vitais ou, ainda, o comprometimento do sistema enzimático (Cowan, 1999; Wendakoon & Sakaguchi, 1995).

TABELA 5 Componentes químicos do óleo essencial de *Thymus vulgaris* encontrados

Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>					
Pico	TR	IKcal	IKtab	CM±D	Composto
1	8,27	928	931	1,74±0,07	α-tujona
2	8,52	937	936	1,08±0,05	α-pineno
3	10,52	978	980	2,32±0,06	β-pineno
4	11,03	988	991	2,26±0,08	β-mirceno
5	12,12	1015	1018	1,39±0,04	α-terpineno
6	12,54	1023	1026	21,72±0,59	p-cimeno
7	14,17	1058	1062	12,61±0,32	γ-terpineno
8	16,16	1162	1165	2,69±0,03	borneol
9	19,27	-	-	1,53±0,01	n.i
10	19,85	-	-	1,19±0,01	n.i
11	25,75	1287	1290	47,73±0,77	timol
12	26,00	1296	1298	3,47±0,07	carvacrol

TR = tempo de retenção, IKcal = índice Kovat's calculado, IKtab = índice Kovat's tabelado (Adams, 1995), CM (%) ± DP = concentração média (%) ± desvio padrão da média, obtidos de três repetições de injeção do óleo essencial no CG-FID e N.I. = composto não identificado.

Houve efeito significativo para a interação entre os óleos essenciais de *S. aromaticum* e *T. vulgaris* nas diferentes concentrações utilizadas sobre as culturas de *P. fluorescens* ATCC 13525 e *P. aeruginosa* ATCC 25853 (Figuras 9, 10, 11 e 12, respectivamente).

Os dados apresentados nas Figuras 9 e 10 mostram que o óleo essencial de *T. vulgaris* apresentou maior efeito inibitório sobre *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*. Nota-se que, nos poços contendo soluções menos diluídas de óleo, os halos de inibição foram bem pronunciados, em virtude da maior concentração do princípio ativo.

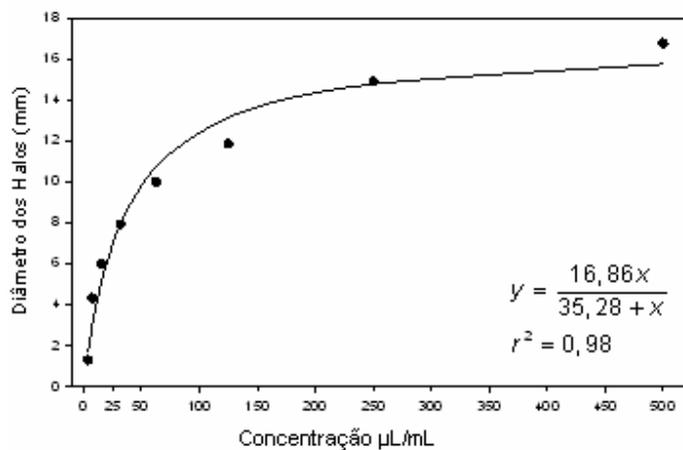


FIGURA 9 Valores médios (pontos) e estimados (linha) de diâmetro dos halos de inibição formados por *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 frente ao óleo de *Thymus vulgaris*.

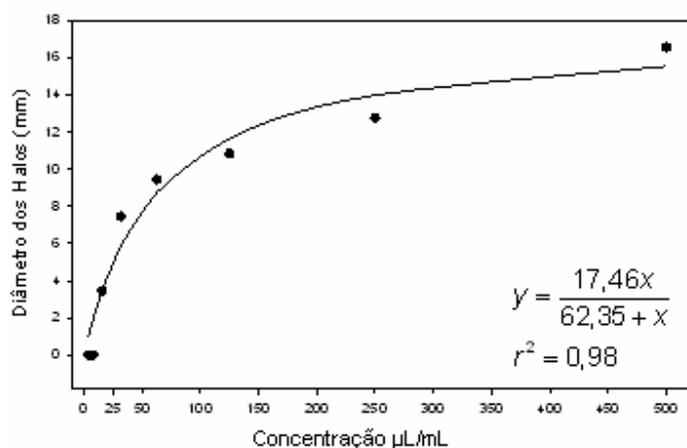


FIGURA 10 Valores médios (pontos) e estimados (linha) de diâmetro dos halos de inibição formados por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 frente ao óleo de *Thymus vulgaris*

Burt (2004) constatou que os compostos ativos timol e carvacrol provocam distorção na estrutura física da célula, causando expansão e, conseqüentemente, desestabilidade na membrana, modificando sua permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais e alterando a força próton motora por meio de variações no pH e no potencial elétrico. O timol presente em óleo essencial de tomilho é um composto fenólico, com ação sobre a célula bacteriana não muito bem descrita. A ação desses compostos ocorre sobre a membrana celular, onde o timol, provavelmente, desorganiza a estrutura, promovendo desnaturação de enzimas essenciais. Helander et al. (1998) relataram a desintegração da membrana citoplasmática aumentando a permeabilidade de ATP pela ação do timol.

Nota-se que a solução de óleo de *S. aromaticum* também apresentou significativa atividade antimicrobiana sobre as culturas reveladoras utilizadas, *P. fluorescens* e *P. aeruginosa* (Figuras 11 e 12).

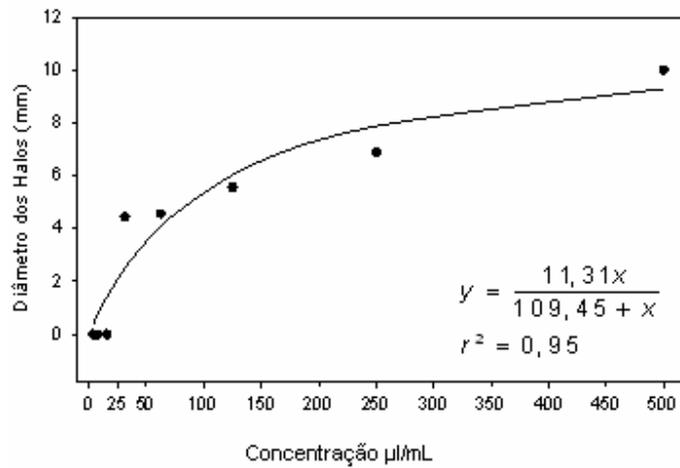


FIGURA 11 Valores médios (pontos) e estimados (linha) de diâmetro dos halos de inibição formados por *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 frente ao óleo de *Syzygium aromaticum*

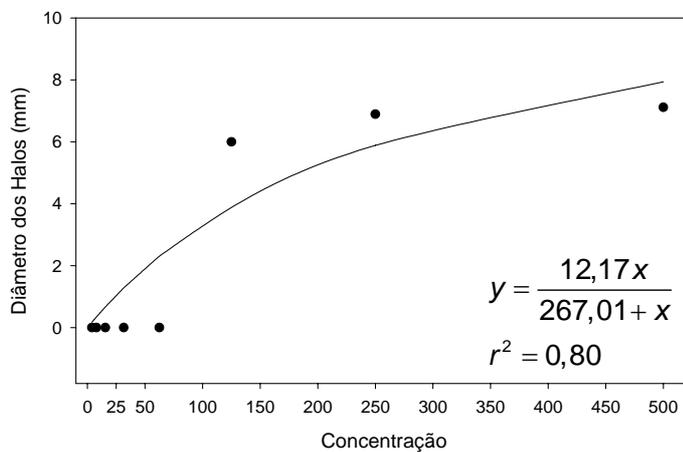


FIGURA 12 Valores médios (pontos) e estimados (linha) de diâmetro dos halos de inibição formados por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 frente ao óleo de *Syzygium aromaticum*

Laeckeman et al. (1990) demonstraram a atividade *in vitro* do eugenol sobre o crescimento de fungos, leveduras e bactérias, não ocorrendo atividade inibitória sobre vírus.

Craveiro (1981) atribui as excelentes propriedades do cravo-da-índia ao eugenol, componente majoritário encontrado em 80% a 90% do óleo essencial desta planta. Segundo este autor, o eugenol provoca inibição na produção de amilase e de proteases pela célula, bem como sua deterioração e lise.

4.3 Formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*

Para a avaliação da eficiência das soluções detergentes sanificantes, foram escolhidas duas dentre as quatro empregadas na etapa anterior. Os critérios de seleção de óleos essenciais para a elaboração das soluções foram maior rendimento ao final do processo de extração e presença e ausência de atividade bactericida *in vitro* em ágar Müller-Hinton. A opção de se trabalhar com um óleo sem atividade antimicrobiana (sálvia) deveu-se ao fato de testá-lo em condições diferentes das empregadas em superfície cavidade ágar. Os biofilmes foram submetidos a diferentes condições de temperatura e tempo de exposição daqueles experimentados pelas células em ágar. Melhores condições de crescimento e adesão foram conseguidos com *P. aeruginosa*, não tendo a população de *P. fluorescens* alcançado o valor sugerido por Andrade et al. (1998) para que a população aderida fosse considerada biofilme.

Os resultados observados durante 10 dias de avaliação da quantificação de células sésseis e planctônicas de *Pseudomonas aeruginosa* podem ser visualizados nas Figuras 13 e 14.

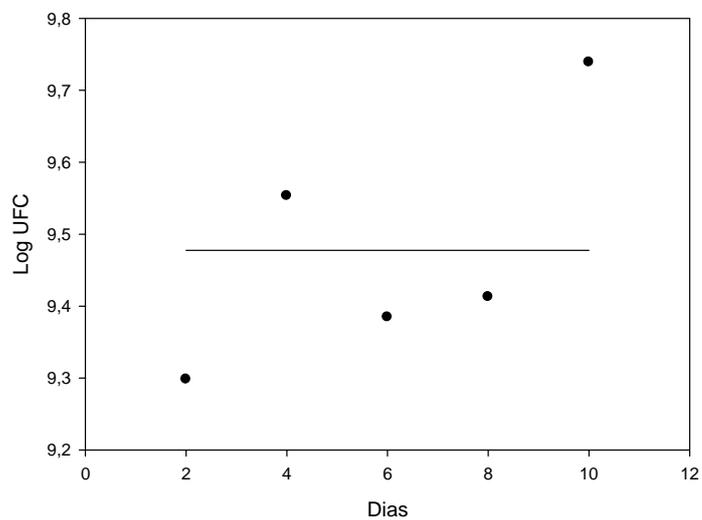


FIGURA 13 Valores médios (pontos) do número da população de bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 em leite, durante 10 dias de avaliação

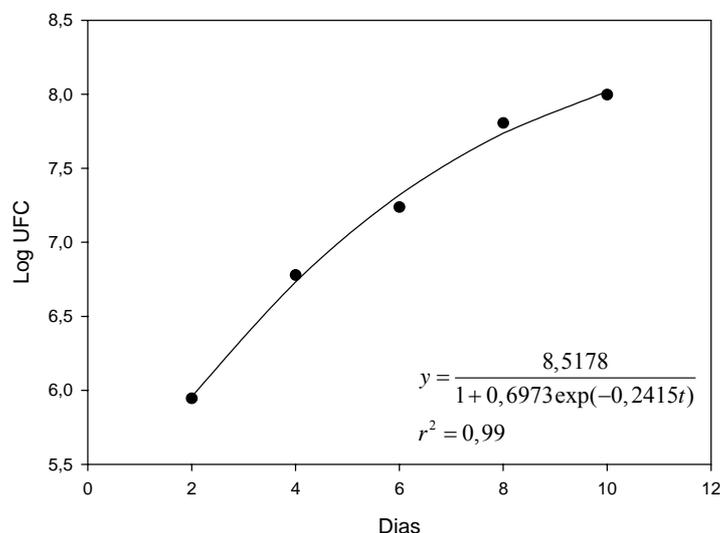


FIGURA 14 Valores médios (pontos) e estimados (linha) do número da população de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 aderida em cupons de aço inoxidável durante 10 dias

Na Figura 14 é apresentada a curva de crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em cupons de aço, em que se pode observar uma taxa de crescimento de 0,2415. Para o crescimento da bactéria em leite (forma planctônica), não foi possível ajustar curva de crescimento, pois todos os parâmetros foram não significativos (Figura 13).

Durante os quatro primeiros dias de avaliação da adesão, as contagens médias de células sésseis foram de 10^6 UFC/cm². Nota-se que, a partir do 6º dia de avaliação, houve aumento do crescimento da população sésseis, tendo o ápice do crescimento sido atingido após 10 dias de cultivo. Considerando-se que, no tempo inicial (T0), foram inoculados 10^8 UFC/mL de leite e que, a cada dois dias, uma troca do leite UHT estéril era realizada, a partir do 4º dia houve biotransferência para o leite. A perda de células a partir de um biofilme não se

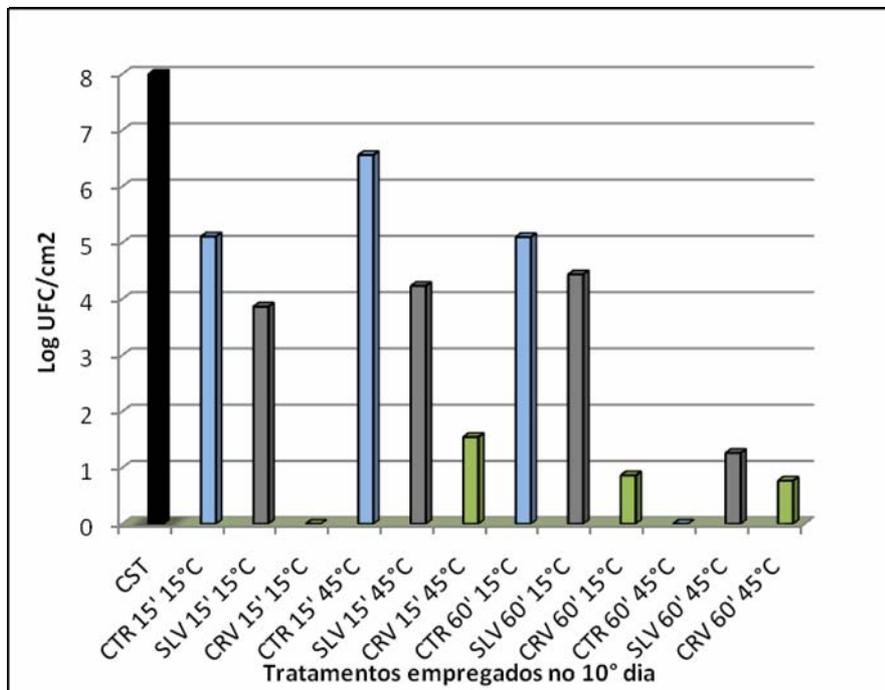
limita ao último estágio do biofilme, mas pode ocorrer continuamente em baixos níveis, durante o processo de formação de biofilme (Applegate & Bryers, 1991; Fux et al., 2004; Sauer et al., 2002; Sauer et al., 2001). Essa perda de células a partir de um biofilme pode ser devido à lise celular ou à remoção de células intactas e viáveis.

Vários mecanismos têm sido descritos, que resultam na remoção de células intactas. A remoção de células intactas e viáveis pode ser inespecífica ou passiva, tal como o destacamento de biofilme sob limitações na taxa de transferência de massa de oxigênio nas camadas dos biofilmes ou sob estresse hidrodinâmico, devido ao cisalhamento pelo movimento do líquido circulante no biofilme (Applegate & Bryers, 1991; Choi & Morgenroth, 2003; Picioreanu et al., 2001).

No décimo dia de avaliação da adesão em cupons de aço, evidenciou-se uma população séssil considerada biofilme, corroborando com informações de Andrade et al. (1998), os quais sugerem que seja necessário o número mínimo de 10^7 células aderidas por cm^2 , para se considerar uma população aderida como biofilme.

4.4 Avaliação dos tratamentos empregados para remoção de biofilmes

Os resultados das contagens de UFC/ cm^2 , nos grupos testemunha (CST), controle (NaOH 1%) e tratados com soluções detergentes sanificantes, estão expressos na Figura 15.

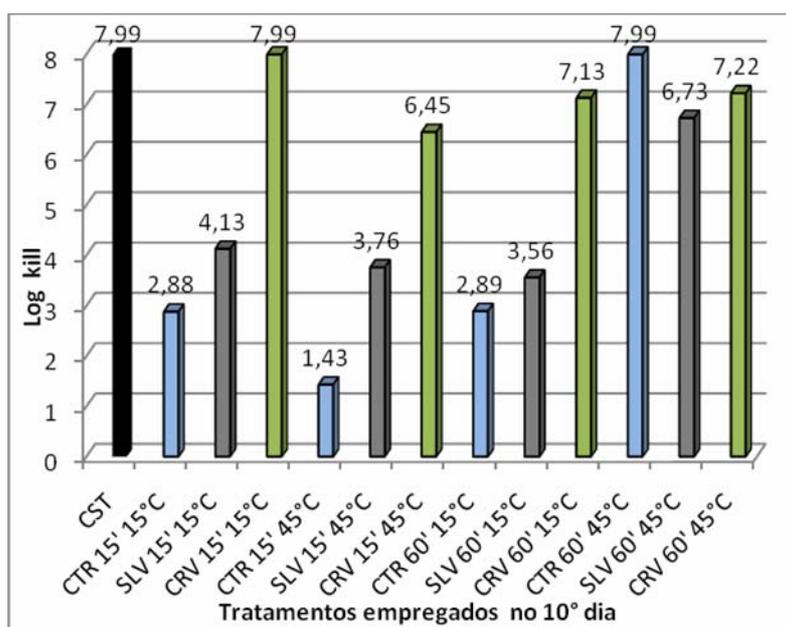


CST = testemunha; CTR = controle; SLV = sálvia e CRV = cravo-da-índia

FIGURA 15 Resultados de contagens de *Pseudomonas aeruginosa* em cupons de aço sem tratamento e com tratamentos em diferentes tempos e temperaturas de exposição.

Maior média de Log UFC/cm² (7,9 ciclos Log) foi observada no grupo testemunha, tendo este apresentado maior desenvolvimento de células sésseis ao final de 10 dias de cultivo. Este tratamento não diferiu significativamente do controle. Demonstrou-se que os óleos essenciais foram eficientes na redução da população, resultando nos menores valores de Log UFC/cm². Os mesmos podem ser utilizados em temperaturas menores do que aquela na qual o NaOH apresentou maior efeito, uma vez que altas temperaturas podem desencadear a incrustação de proteínas na linha de processamento.

Os valores de Log Kill obtidos após o cálculo estão expressos na Figura 16.



CST = testemunha; CTR = controle; SLV = sálvia e CRV = cravo-da-índia

FIGURA 16 Valores de Log Kill após tratamentos com soluções detergentes sanificantes, em diferentes tempos e temperaturas de exposição.

A solução detergente sanificante de cravo-da-índia mostrou-se eficaz em todas as temperaturas e tempos testados, tendo em todos os tratamentos atingido valores superiores a 5 reduções decimais (RD), ao contrário da solução sanificante de sálvia, a qual só alcançou valor superior a 5 RD no tempo de exposição 60 minutos a 45°C. Os microrganismos aderidos apresentam maior resistência à ação de sanificantes (Mosteller & Bishop, 1993). Os mecanismos

de reduzida suscetibilidade de células presentes no biofilme bacteriano a antibióticos e biocidas têm sido assunto de considerável número de debates e experimentações. Estes mecanismos incluem: (i) reduzido acesso das moléculas de biocidas às células bacterianas, (ii) interações químicas entre biofilme e biocida, (iii) modulação do microambiente, produzindo nutrientes e oxigênio limitados (iv) produção de enzimas degradativas que podem ser eficazes em baixas concentrações biocidas no biofilme, (v) trocas genéticas entre as células, (vi) quorum sensing, (vii) presença de organismos persistentes e sobreviventes em bolsas, (viii) mutação e adaptação dentro do biofilme e (ix) efluxo biocida (Russell, 2003).

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 até 5 reduções decimais (RD) após 30 segundos de contato a 20°C. Mas, em meios de cultivos, sólidos ou líquidos, não há a formação de glicocálix, fundamental ao processo de adesão (Macedo, 2004). Porém, reportando às condições experimentais de cultivo e crescimento dos microrganismos utilizados nesse trabalho, não se pode descartar a ação biocida da solução de sálvia, uma vez que reduziu a população sésil em quantidades que variaram entre 3,5 a 6,7 RD, podendo ser aplicada em processos de adesão, reduzindo a população a baixos níveis de detecção ou, até mesmo, erradicação, dependendo da carga microbiana da superfície acometida. Os estudos sobre atividade biocida de óleos essenciais em biofilmes são poucos e ainda não existe legislação específica sobre o tema. Assim, qualquer redução obtida pode ser considerada como eficiente “com ressalvas”.

De acordo com os dados da Figura 16, supõe-se que o hidróxido de sódio exerça sinergismo com os óleos essenciais, podendo o efeito do óleo essencial ser mascarado pela volatilização do mesmo pela elevação da temperatura e o prolongamento do tempo de exposição. Essa hipótese pode ser

verificada com a utilização de temperatura constante de 45°C, por período de exposição mais elevado (60 minutos), havendo a erradicação de toda a população séssil. Sabe-se que o calor, energia térmica, tem ação efetiva sobre a eficiência da higienização. Ressalta-se que o nível de temperatura a ser utilizado é limitado pela característica do resíduo a ser removido e pelo processo de higienização a ser utilizado (Macedo, 2004). Dessa forma, para melhor verificação da atividade biocida de óleos essenciais em associação ao hidróxido de sódio, torna-se mais interessante o emprego de temperaturas inferiores a 45°C por tempo de exposição inferior ao tempo máximo empregado neste estudo. Maiores estudos precisam ser alavancados para o melhor conhecimento sobre o espectro de ação dos óleos essenciais e até que ponto não possuem seu efeito mascarado pela solução de NaOH 1% associada aos óleos.

Ressalta-se que, nem sempre, quanto maior o tempo de contato mais eficiente será a higienização, pois as reações químicas ocorrem com mais eficiência no início da aplicação dos produtos químicos e, muitas vezes, os resíduos gerados pelas reações mais demoradas levam a um maior custo do procedimento (Macedo, 2004).

4.4.1 Comparação entre os tratamentos empregados

Foram comparadas soluções elaboradas com óleos essenciais de cravo-da-índia e sálvia, respectivamente e com o controle (NaOH 1%), quanto à capacidade de remoção de células sésseis após 10 dias de cultivo. Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre a atuação dos óleos essenciais de cravo-da-índia e sálvia, tendo este último não diferido significativamente do controle avaliado.

TABELA 6 Valores médios de redução média de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 observados após tratamentos com soluções detergentes sanificante

Tratamentos	Redução média
Cravo-da-índia	7,20 a
Sálvia	4,06 b
Controle	3,80 b

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

O óleo essencial de cravo-da-índia apresentou a maior redução média de Log UFC/cm², sendo este o que melhor reduziu a população aderida aos cupons de aço (Tabela 6). A atividade bactericida de sálvia foi demonstrada sobre biofilmes quando associada ao hidróxido de sódio em temperaturas e condições diferentes daquelas demonstradas sobre células crescendo em ágar Müeller-Hinton.

4.4.2 Efeito do binômio tempo x temperatura sobre a exposição de biofilme a soluções detergentes sanificante

Os efeitos das combinações entre diferentes tempos e temperaturas foram estudados. Foram verificadas possíveis diferenças entre os tempos (15 e 60 minutos) e temperaturas (15°C e 45°C). Os resultados estão expressos na Tabela 7.

TABELA 7 Valores médios de redução média de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 observados após diferentes tempos de exposição e temperatura

Temperatura	Tempo	
	15 minutos	60 minutos
15°C	5,48 Aa	4,96 Aa
45°C	4,32 Aa	7,10 Bb

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Ao se comparar os fatores tempo e temperatura de exposição dos cupons aos óleos essenciais e controle (NaOH 1%), para cada tratamento, constatou-se diferença significativa no tempo de exposição 60 minutos a 45°C.

Pelo teste de Scott-Knott, nota-se que o tempo de exposição 60 minutos a 45°C, proporcionou maior redução média de valores Log UFC/cm² (redução de 7,9 ciclos Log) (Fig 16) da população. Nota-se que maiores valores de redução a 15°C foram alcançados empregando-se tempo de exposição mais curto (15 minutos). Maiores valores de redução foram observados para o óleo essencial de cravo-da-índia, tendo este diferido significativamente do óleo essencial de sálvia.

Pelo teste de Scott-Knott não foi observada diferença significativa entre os tempos de exposição avaliados na temperatura de 15°C. À temperatura de 45°C, observa-se que o tempo de exposição de 60 minutos apresentou média de Log UFC/cm² maior e mais significativa que a apresentada no tempo de exposição de 15 minutos. O tratamento a 45°C por 60 minutos apresentou reduções de 7,9; 7,2 e 6,7 ciclos Log para o grupo controle, cravo-da-índia e sálvia, respectivamente, podendo ser considerado mais eficiente que o

tratamento a 45°C por 15 minutos, o qual reduziu a 1,4; 3,7 e 6,4 ciclos Log para os grupos controle, sálvia e cravo-da-índia, respectivamente (Figura 16).

Deve-se ressaltar a importância do conhecimento e da obediência das melhores condições de tempo e temperatura, de emprego das soluções biocidas, para maior eficácia do produto.

5 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de tomilho e cravo-da-índia apresentaram ação biocida, tendo o tomilho apresentado melhores resultados. Os óleos de sálvia e alecrim não tiveram atividade sobre os microrganismos utilizados.

As soluções detergentes sanificante de cravo-da-índia e sálvia mostraram atividade bactericida, tendo a solução de cravo-da-índia apresentado melhores resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gás cromatografy/mass spectroscopy**. Illinois: Allure Publishing Corporation, 1995. 469 p.

AL-TAHHAN, R.A.; SANDRIN, T.R.; BODOUR, A.A.; MAIER, R.M. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p.3262–3268, Aug. 2000.

AMORIM, M. B. **Estudo da reatividade de derivados do safrol frente ao cloreto de alumínio**. 1989. Dissertação (Mestrado) – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.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**, Ames, 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.

APPLEGATE, D.H.; BRYERS, J.D. Effects on carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.37, n.1, p.17–25, 1991.

ARIDOGAM, B.C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives Pharmacal Research**, Souç, v.25, n.6, p.860-864, Dec. 2002.

ATTI-SANTOS, A.C., ROSSATO, M. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, n.1, p.155-160, Jan./Mar. 2005.

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

BALDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623p.

BARBOUR, E.K.; AL SHARIFA, M.; SAGHERIANA, V.K.; HABREA, A. N.; TALHOUK, R.S.; TALHOUK, S.N. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.93, p.-7, July 2004.

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

BASSLER, B.L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion Microbiology**, London, v.2, n.6, p.582–587, Dec. 1999.

BAUER, K.; ARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor Materials. Germany: Wiley-VCH, 3. ed., 1997.

BLACKMAN, I.C.; FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.8, p.827–831, Aug. 1996.

BLENKINSOPP, S.A.; KHOURY, A.E.; COSTERTON, J.W. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.11, p.3770–3773, Nov. 1992.

BLUM, C.; KUBECZKA, K. H.; BECKER, K. Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.) **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.773, n.1/2, p.377-380, June 1997.

BOLLINGER, N.; HASSETT, D. J.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; McDERMOTT, T.R. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, n.6, p.1990–1996, Mar. 2001.

BOYD, R.D.; COLE, D.; ROWE, D., VERRAN, J.; PAUL, A.J.; WEST, R.H. Cleanability of soiled stainless steel as studied by atomic force microscopy and

time of flight secondary ion mass spectrometry. **Journal of Food Protection**, Ames, v.64, n.1, p.87–93, Jan. 2001.

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

BURSTEIN, G.T.; VINES, S.P. Repetitive nucleation of corrosion pits on stainless steel and the effects of surface roughness. **Journal of the Electrochemical Society**, Pennington, v.48, n. 12, p.504–516, Dec. 2001.

CAPASSO, R.; IZZO, A.I.; CAPASSO, F.; ROMUSSI, G.; BISIO, A.; MASCOLO, N. A diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits mouse intestinal motility in vivo. **Planta Medica**, stuttgart, v.70, n. 4, p.375–377, Apr. 2004.

CASTRO, H.G. de; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Metabólitos secundários**: contribuição ao estudo de plantas medicinais. 2.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. 113p.

CASTRO, D.P.; CARDOSO, M.G.; MORAES J.C.; SANTOS, N.M.; BALIZA, D.P. Não preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: *Noctuidae*) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, p.27-32, 2006.

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

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

CHANG, Y.I.; CHANG, P.K. The role of hydration force on the stability of the suspension of *Saccharomyces cerevisiae* – application of the extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, Amsterdam, v.211, n.1, p.67-77, 2002.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Chicago, v.17, n.1, p.46-55, 1952.

CHOI, Y.C.; MORGENROTH, E. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. **Water Science Technology**, London, v.47, n.5, p.69–76, 2003.

CONNER, D.E.; BEUCHAT, L.R. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. **Journal Food Science**, Chicago, v.49, n.2, p. 429-434, Mar/Apr. 1984.

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

COSTERTON, J.W.; WILSON, M. Introducing biofilms. Cambridge: Cambridge University, 2004. v. 1, p. 1-4.

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

CRAVEIRO, A.A.; FERNADES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, N.I.L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: UFC, 1981. 209 p.

CRIADO, M.T.; SUAREZ, B.; FERREIROS, C.M. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. **Food and Technology**, Chicago, v.48, n.2, p.123–126, Feb.1994.

CROTEAU, R.; FELTON, M.; KARP, F.; KJONAAS, R. Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). **Plant Physiology**, Rockville, v.67, n.4, p.820-824, Apr. 1981.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.73, n.5, p.645-652, May 1996.

DAGBERT, C.; MEYLHEUC, T; BELLON-FONTAINE, M.N. Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Electrochimica Acta**, Oxford, v.51, n.24, p.5221–5227, July 2006.

DAS, J.R.; BHAKOO, M.; JONES, M.V.; GILBERT, P. Changes in the biocide susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* cells

associated with rapid attachment to plastic surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.5, p.852–858, May 1998.

DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P.; FRIZZO, C.D.; ATTI-SERAFINI, L.; DUGO, P. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential Oils from the South of Brazil and Uruguay. **Journal of Essential Oils Research**, New York, v.11, p. 27-30, 1999.

DELAMARE, A.P.; MOSCHEN-PISTORELLO, I.T.; LIANE, A.; ATTI-SEFRANI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Institute of Biotechnology**, University of Caxias do Sul, RS. September 2005.

Den AANTREKKER, E.D.; BOOM, R.M.; ZWIETERING, M.H.; SCHOTHORST, M.V. Quantifying recontamination through factory environments - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, n.2, p.117-130, Jan. 2003.

DEETH, H.C.; TOUCH, V. Methods for detecting lipase activity in milk and milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v.55, n. 3, p.153-168, 2000.

DEWEGER, L.A.; VAN DER VLUGT, C.; WIJFJES, A.H.M.; BAKKER, P.A.A.M.; SCHIPPERS, B.; LUGTEMBERG, B.. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. **Journal of Bacteriology**, Amsterdam, v.73, n.2, p. 2769–2773, Jan.1987.

DORMAN, H.J.D. **Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities**. 1999. Thesis (Doctor OHD) - University of Strathclyde, Glasgow.

DUKE, J.A. Biologically: active compounds important spices. In: CHARALAMBOUS, G. Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevier Publishers, 1994. **Egyptian Journal of Horticulture**, Cayro, v.27, p.459-478, 2002.

DUNNE JÚNIOR, W.M. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.15, n.2, p.155-166, 2002.

- DÜRR, H. Influence of surface roughness and wettability of stainless steel on soil adhesion, cleanability and microbial inactivation. Trans IChemE, Part C. **Food and Bioproducts Processing**, ruby, v.85, n.1, p.49–56, Mar. 2007.
- ECONOMOU, K.D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Champain, v.68, n.2, p.109-113, Feb. 1991.
- ELDER, M.J.; STAPLETON, F.; Evans, E.; DART, J.K.G. Biofilm-related infections in ophthalmology. **Eye**, London, v.9, n.1, p.102–109, 1995.
- ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Oxford, v.70, n.3, p 343-349, June 2000.
- FARG, R.S.; DAW, Z.Y.; ABO-RAYA, S.H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflotoxins in synetic medium. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.1, p.74-76, Jan./Feb. 1989.
- FATEMI, P.; FRANK, J.F. Inactivation of *Listeria monocytogenes*/*Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. **Journal of Food Protection, Ames**, v.62, n.7, p.761–765, July 1999.
- FERREIRA, D.F. **Sistema de análises de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos..** Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1).
- 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, MG.
- 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**, Oxford, v.43, n.4, p 235–242, Mar. 2000.
- FRANCO, M.R.B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais.** São Paulo: Livraria Varela, 2003. 246 p.
- FRANK, J.H.; KOFI, R.A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53. n.7, p.550-554, July 1990.

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

FUX, C.A.; WILSON, S.; STOODLEY, P. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, n.14, p.4486–4491, July 2004.

GALLARDO-MORENO, A.M.; GONZALEZ-MARTIN, M.L.; PEREZ-GIRALDO, C. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v.271, p.351–358, 2002.

GANESH, C.K.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.4, n.1-2, p.29–27, 1998.

GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, Amsterdam, v.18, n.9, p.1049-1056, Sept. 2008.

GRELLA, G. E., PICCI, V. Variazioni stagionali dell'olio essenziale di *Salvia officinalis*. **Fitoterapia**, Milano, v.59, n.1, p.97–102, 1998.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C. Physicans Desk References (PDR) for herbal medicines. **Medical Economics Company**. New Jersey, 858 p. 2000.

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

GUILLEN, M.D.; CABO, N.; BURILLO, J. Characterization of the essential oil of some cultivated aromatic plants of industrial interest. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.70, n.3, p.359-363, Mar. 1996.

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

HANCOCK, R.E.W; SIEHNEI, R.; MARTIN, N. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, n.7, p.1069–1075, July 1990.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.80, n.1, p.177-188, July 1996.

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

HERMANSSON, M. The DLVO theory in microbial adhesion. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.14, n.1-4, p.05–119, Aug. 1999.

HILBERT, L.R.; BAGGE-RAVNB, D.; KOLDC, J.; GRAMB, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.52, n.3, p.175–185, 2003.

IKAN, R. **Natural Products**. 2.ed. San Diego: Academic, 1991.360p.

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.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.236, n.2, p.163-173, July 2004.

JENKINSON, H.F.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, London, v.9, n.1, p.9-10, Jan. 2001.

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

JOHNSON, L.R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, London, v.251, n.1, p.24-34, Jan. 2007.

JORDÁN, M.J.; MARTÍNEZ, R.M.; CASES, M.A.; SOTOMAYOR, J.A. Watering level effect on *Thymus hyemalis* Lange essential oil yield and composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, n.18, p.5420–5427, Aug. 2003.

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

KUTCHAN, T.M. Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, n.1, p.58-60, Jan. 2001.

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

LAEKCMAN, G.M. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. **Phytotherapy Research**, Sussex, n.3, v.4, p.90-96, June 1990.

LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.; ALENCAR, J.W.; CRAVERO, A.A.; CLARK, A.M. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, Sussex, v.4, n.2, p.82-84, Apr.1990.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 45, n.4, p.999–1007, Apr. 2001.

LECHEVALIER, M.W.; BABCOCK, T.M.; LEE, R.G. Examination and characterization of distribution system biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.12, p.2714-2724, Dec. 1987.

LINDROTH, R. L.; HSIA, M. T. S.; SCRIBER, J. M.; Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.15, n.6, p.681-686, 1987.

LIU, Y.; YANG, S.; XU, H.; et al. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.110, n.3, p.251–6, June 2004.

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

MADDULA, V.S.R.K.; ZHANG, Z.; PIERSON, E.A; PIERSON, L.S. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis (aureofaciens)* strain 30-84. **Microbial Ecology**, New York, v.52, n.2, p.289-301, Aug. 2006.

MAHMOUD, A. L. Antifungal action and antiflatogenic properties of some essential oil constituents. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, n.2, p.110-113, Aug. 1994.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n.3, p.187–195, Aug. 2001.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 220p.

McHOY, P.; WESTLAND, P. **The Herb Bible**. New York: Barnes & Noble, 1994.

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

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 70p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxford, v.51, n.4, p.249 – 253, 2003.

MONTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.96, n.1-2, p.177-181, Jan. 2005.

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

MOTT, I.E.C.; STICKLER, D.J.; COAKLEY, W.T.; BOTT, T.R. The removal of bacterial biofilm from water-filled tubes using axially propagated ultrasound. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.4, p.509–514, Apr. 1998.

NAGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. São paulo: Bei Comunicação, 2003.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiological Reviews**, Washington, v.49, n.1, p.1–32, 1985.

NORMAN, R.S; FRONTERA-SUAU, R.; MORRIS, P.J. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Expression during Crude Oil Degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.8, n.10, p. 5096-5103, Oct.. 2002.

OLIVEIRA, R.; MELO, L.; OLIVEIRA, A. Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.2, n.1, p.41–46, 1994.

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

OULAHAL, N.; MARTIAL –GROS, A.; BONNEAU, N.; BLUM, L.J. Removal of meat biofilms from surfaces by ultrasounds combined with enzymes and/or a chelating agent. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.8, n.2, p.192-196, June 2007.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Québec, v.18, n.5, p.414-420, May 2007.

PARSEK, M.R.; SINGH, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.57, p.677–701, 2003.

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

PEREIRA, M.A.; ALVES, M.M.; AZEREDO, J.; MOTA, M.; OLIVEIRA, R. Influence of physico-chemical properties of porous microcarriers on the

adhesion of an anaerobic consortium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.24, n.3, p.81-186, Mar. 2000.

PHUTHI, J. S. **Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology**. New York: Academic, 1980. 449p.

PICCAGLIA, R.; MAROTTI, M.; GIOVANELLI, E.; DEANS, S. G.; EAGLESHAM, E. Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.2, n.1, p.7-50, 1993.

PICIOREANU, C.; van LOOSDRECHT, M.C. HEIJNEN, J.J. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.72, n.2, p.205-218, Jan. 2001.

PIZZOLITTO, E.L.; PIZZOLITTO, A.C.; POZETTI, G.L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminium tubes both unlined and lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.4, p.340-344, Oct./Dec. 2001.

POSER, G.L. MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. 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: UFSC, 2004. 1102p.

PUTIEVSKY, E.; RAVID, D.; DIWAN-RINZLER, N., ZOHARY, D. Genetic affinities and essential oil composition of *Salvia officinalis* L., *S. fruticosa* Mill., *S. tomentosa* Mill., and their hybrids. **Flavour and Fragrance Journal**, Oxford, v.5, p.121-123, 1990.

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

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

REDY, M.V.B.; ANGERS, P.; GOSSELIN, A.; ARUL, J. Characterization and use of essential oil from *T. vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. **Phytochemistry**, Oxford, v.47, n.8, p.1515-1520, Apr.1998.

REN, Y.; HOUGHTON, P.J.; HIDER, R.C.; HOWES, M.J.R. Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorhiza*. **Planta Medica** Stuttgart, v.70, p.201–204, 2004.

RIBEIRO-FURTINI, L.L.; ABREU, L.R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p.358-363, mar./abr. 2006.

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

RONNER, A.B.; WONG, A.C.L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Ames, v.56, n.9, p.750-758, Sept. 1993.

ROSSONI, E. M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracet acid as sanitising 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.

RUIZ, N.; KAHNE, D.; SILHAVY, T. J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, London, v.4, n.1, p.57–66, Jan. 2006.

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

RUTTER, P.R.; VINCENT, B. **Microbial adhesion to surfaces**. London: Ellis Horwood, 1980.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. 48p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 20).

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

SANTOS, A.L. **Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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: UFSC, 2004. 1102 p.

SARTORATTO, A. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, n.3, p.275-280, July/Sept. 2004.

SAUER, K.; CAMPER, A.K. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, p.6579–6589, 2001.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHRLICH, G.D; COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.184, n.4, p.1140–1154, Feb. 2002.

SCHMAUS, G.; KUBECZKA, K.H. The influence of isolation conditions on the composition of essential oils containing linalool and linalyl acetato. In: BAERHEIN SVENDSEN, A.; SCHEFFER, J.J.C. (Ed.). **Essential oils and aromatic plants**. Dordrecht: Nijhoff/Dr. Junk, 1985. p.127-134.

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

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

SHELEF L.A.; JYOTHI, E.K.; BULGARELLI, M.A. Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and food. **Journal Food Safety**, Trumbull, v.4, n.1, p.35-58, 1982.

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

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

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

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleo essencial**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 135p.

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

SOTOMAYOR, J. A.; MARTÍNEZ, R. M.; GARCÍA, A. J.; JORDÁN, M. J. Thymus zygis subsp. gracilis: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.17, p.5418–5424, Aug. 2004.

STEPHENS, C. Microbiology: breaking down biofilms. **Current Biology**, Cambridge, v.12, n.4, p132–p134, Feb. 2002.

SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, Oxford, v.11, n.9, p.663–674, 2001.

SUTHERLAND, I.W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v.38, n.4, p.319–328, 1999.

TEIXEIRA, P; LOPES, Z.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R.; VIEIRA, M.J. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, London, v. 22, n.2/3, p.247-251, Apr./June 2005.

TEWARI, R.; VIRMANI, O.P. Chemistry of rosemary Oil: a review. **Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants**, Lucknow, v.9, p. 185-197, 1987.

TUCKER, A.; MACIARELLO, M.J.; HOWELL, J.T. Botanical aspects of commercial sage. **Economic Botany**, New York, v.34, n.1, p.6–19, 1980.

TYRREL, M. H. Evolution of natural development with the assistance of modern technologies. **Food Technology**, Chicago, v.44, n.1, p. 68-72, Jan. 1990.

VERRAN, J.; BOYD, R.D. The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: a review. **Biofouling**, Abingdon, v.17, n.1, p.59–71, 2001.

VIEIRA, L.S.; ALBUQUERQUE, J.M. **Fitoterapia tropical** – manual de plantas medicinais. Belém: FCAP/Serviço e Documentação e Informação, 1998.

WALKER, J.T.; BRASHAW, D.J.; BENNETT, A.M.; FULFORD, M.R.; MARTIN, M.V.; MARSH, P.D. Microbial formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.8, p.3363–3367, Aug. 2000.

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

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Ames, v.59, n.7, p.727-733, July 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, Dec.2005.

WERNER, E.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M.J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; PITTS, B.; STEWART, P.S. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.10, p.6188–6196, Oct. 2004.

WOOD, P.; JONES, M.; BHAKOO, M.; GILBERT, P.A novel strategy for control of microbial biofilms through generation of biocide at the biofilm-

surface interface. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n., p. 2598–2602, July 1996.

WOOD, P.; CALDWELL, D.E.; EVANS, E.; JONES, M.; KORBER, D.R.; WOLFHAARDT, G.M.; WILSON, M.; GILBERT, P. Surface-catalysed disinfection of thick *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.6, p.1092–1098, June 1998.

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

ZUO, Y.; WANG, H.; XIONG, J. The aspect ratio of surface grooves and metastable pitting of stainless steel. **Corrosion Science**, Oxford, v.44, n.1, p. 25–35, Jun. 2002.