



LETÍCIA ANDRADE DO VALE

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE
BIOFILME FORMADO POR
Cronobacter sakazakii EM SUPERFÍCIE
DE POLIPROPILENO**

LAVRAS – MG

2015

LETÍCIA ANDRADE DO VALE

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILME
FORMADO POR *Cronobacter sakazakii* EM
SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO**

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

Orientadora

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientadora

Dra. Carolina Valeriano de Carvalho

LAVRAS – MG

2015

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

Vale, Leticia Andrade do.

Ação de óleos essenciais sobre biofilme formado por *Cronobacter sakazakii* em superfície de polipropileno / Leticia Andrade do Vale. –
Lavras : UFLA, 2015.

73 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras,
2015.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli.

Bibliografia.

1. Bactéria patogênica. 2. Células planctônicas. 3. Sanificante
natural. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LETÍCIA ANDRADE DO VALE

**AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE BIOFILME
FORMADO POR *Cronobacter sakazakii* EM
SUPERFÍCIE DE POLIPROPILENO**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dra. Carolina Valeriano de Carvalho UFLA

Dra. Maíra Maciel Mattos de Oliveira IFES

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Orientadora

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, por iluminar meu caminho e me proteger.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, por estarem sempre presentes, me incentivando e orando. Ao meu irmão, Gustavo, pelo amor, incentivo e apoio.

Ao meu noivo, Guilherme, pelo amor, incentivo, paciência e compreensão, nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora, Roberta Hilsdorf Piccoli, pelo apoio, orientação, amizade, paciência e pelos valiosos ensinamentos.

À professora Carol, pela coorientação, amizade, carinho e prontidão em me atender.

A Maíra, por aceitar participar da banca e contribuir para o enriquecimento do trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realizar o mestrado e também aos professores.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, apoio e incentivo, e pelo agradável convívio durante esses anos, em especial à laboratorista Eliane, Nayane, Luciana, Sílvia, Heloísa, Luara, Mariana, Alessandra, Victor, Silas, Rafael, Ítalo e Marcel. Agradeço, em especial, a Tenille e a Aline, pela amizade, carinho e incentivo, pela paciência em me ensinar e ajudar.

À Fapemig, pelo auxílio financeiro.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Cronobacter sakazakii é uma bactéria patogênica gram-negativa, aeróbica facultativa, que pertence à família *Enterobacteriaceae* e está associada à morbidade e à mortalidade, principalmente entre recém-nascidos. Tem se mostrado importante contaminante de leite em pó e fórmulas infantis, apresentando capacidade de formar biofilme. Quando em biofilme, *C. sakazakii* pode apresentar maior tolerância aos agentes sanificantes e, assim, o desenvolvimento de novos agentes sanificantes é significativo. Nesse contexto, os óleos essenciais têm ganhado destaque. Portanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais sobre células planctônicas e em biofilme de *C. sakazakii* em superfície de polipropileno. Foi estudado o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Litsea cubeba*, *Foeniculum vulgare*, *Cinnamomum camphora*, *Illicium verum*, *Myristica fragrans*, *Thymus vulgaris*, *Citrus nobilis*, *Syzygium aromaticum* e *Ocimum basilicum* sobre células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii*. Foram avaliados 10 ensaios sobre o sinergismo dos óleos de canela, menta e ho wood sobre células planctônicas e sésseis e teste de soluções sanitizantes à base de óleos sobre cupons com biofilme de *C. sakazakii*. O teste da atividade antimicrobiana *in vitro* foi realizado baseado na técnica de microdiluição em caldo, seguida de plaqueamento em ágar triptona de soja (TSA), obtendo-se, assim, a CMB para células planctônicas e sésseis, e formulação de soluções sanificantes à base de óleos essenciais, para serem testadas no biofilme formado no cupom de polipropileno. Dentre os óleos essenciais testados nas células planctônicas, canela obteve melhor resultado com CMB 0,125%. No estudo do sinergismo houve ausência do crescimento em todas as combinações testadas. Houve aumento da CMB para as células sésseis; canela e menta apresentaram 1% e ho wood, 2%. Também não foi observado crescimento bacteriano no estudo do sinergismo dos óleos sobre células sésseis. Para o teste realizado no cupom de polipropileno, o tratamento 1 (67% de óleo de canela, 17% de óleo de ho wood, 17% de óleo de menta) foi melhor para o tempo de 10 minutos de contato e, para 20 minutos de contato, o controle 2 (Sandet) foi mais efetivo.

Palavras-chave: Bactéria patogênica. Células planctônicas. Células sésseis. Sanificante natural.

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii is a gram-negative pathogenic bacteria, aerobic optional, that belongs to the family *Enterobacteriaceae* and is associated with significant morbidity and mortality, especially among newborns. It has been an important contaminant in powdered milk and infant formula, presenting ability to form biofilm. When in biofilm *C. sakazakii* may exhibit major tolerance to sanitizing agents, and thus the development of new sanitizing agents is significant. In this context, the essential oils have gained prominence. So the object of this study was to evaluate the antimicrobial activity of various essential oils on planktonic cells and in biofilm of *C. sakazakii* in polypropylene surface. It was studied the antimicrobial effect of essential oils of *Cinnamomum cassia*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita*, *Litsea cubeba*, *Foeniculum vulgare*, *Cinnamomum camphora*, *Illicium verum*, *Myristica fragans*, *Thymus vulgaris*, *Citrus nobilis*, *Syzygium aromaticum* and *Ocimum basilicum* on planktonic cells and sessile of *Cronobacter sakazakii*. It were evaluated 10 tests on the synergism of cinnamon, mint and ho wood oils on planktonic cells and sessile, and also, tests of sanitizing solutions in based oils on coupons with biofilm of *C. sakazakii*. The in vitro antimicrobial activity test was performed based on the broth microdilution technique, followed by standard plate count in tryptone soya agar (TSA), thus, obtaining the MBC (minimum bactericidal concentration) for planktonic and sessile cells and formulation of sanitizing solutions based on essential oils to be tested in the biofilm formed in polypropylene coupon. Among the essential oils tested in the planktonic cells, cinnamon had the best result with MBC 0,125%. In the synergism study there was no growth at all tested combinations. There was an increase of MBC for sessile cells, cinnamon and mint presented 1% and ho wood 2%. It was also not observed bacterial growth in the study of synergism oils on sessile cells. For the test performed in polypropylene coupon, the treatment 1 (67% of cinnamon oil, 17% of ho wood oil, 17% of mint oil) was better for the time of 10 minutes contact and, to 20 minutes of contact, the control 2 (Sandet) was more effective.

Keywords: Pathogenic Bacteria. Planktonic cells. Sessile cells. Natural sanitizer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formação de biofilme (HARRISON; TURNER; CERI, 2005)	21
Figura 2	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários, adaptado de Simões et al. (2004)	26
Figura 3	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.	28
Figuras 4	Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana (NAZZARO et al., 2013)	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição dos óleos essenciais utilizados	49
Tabela 2	Planejamento experimental para avaliação da ação antimicrobiana sinérgica da combinação dos óleos essenciais de canela, howood e menta	52
Tabela 3	Composição das soluções sanificantes.....	55
Tabela 4	Concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais sobre células planctônicas de <i>Cronobacter sakazakii</i>	57
Tabela 5	Concentração mínima bactericida das combinações de óleos essenciais de canela, howood e menta, utilizados nas análises de sinérgismo sobre <i>Cronobacter sakazakii</i>	58
Tabela 6	Concentração mínima bactericida dos óleos essenciais sobre de células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i>	59
Tabela 7	Concentração mínima bactericida das combinações de óleos essenciais de canela, howood e menta, utilizados nas análises de sinérgismo sobre células sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i>	60
Tabela 8	Número de células sésseis (Log UFC/cm ²) de <i>Cronobacter sakazakii</i> , quantificadas nas superfícies de polipropileno, após 48 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais	61

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	<i>Cronobacter sakazakii</i>	14
2.2	Biofilmes	18
2.3	Óleos essenciais	24
2.4	Ação antibacteriana dos óleos essenciais	29
	REFERÊNCIAS	33
	CAPÍTULO 2 Ação de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de <i>Cronobacter sakazakii</i>	46
1	INTRODUÇÃO	46
2	MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1	Local de execução do experimento	48
2.2	Composição e obtenção dos óleos essenciais.....	48
2.3	Sanificante controle	49
2.4	Microrganismo, estocagem e padronização do inóculo	50
2.5	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais sobre células planctônicas	50
2.6	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB _B) de óleos essenciais sobre células sésseis.....	51
2.7	Estudo do sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais sobre células planctônicas	52
2.8	Estudo do sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis	53
2.8	Formação de biofilme bacteriano em superfície de polipropileno ...	54
2.8.1	Higienização dos cupons	54
2.8.2	Adesão das células bacterianas e avaliação da biotransferência	54
2.8.3	Enumeração das células em biofilme	55
2.9	Preparo das soluções sanificantes.....	55
2.10	Tratamento do biofilme com soluções sanificantes contendo óleos essenciais em diferentes tempos de contato	56
2.11	Delineamento experimental e análise estatística	56
3	RESULTADOS	57
3.1	Concentração mínima bactericida dos óleos essenciais sobre células planctônicas de <i>C. sakazakii</i>	57
3.2	Sinergismos entre os óleos essenciais nas células planctônicas.....	58
3.3	Concentração mínima bactericida nas células sésseis	59
3.4	Sinergismos entre os óleos essenciais nas células sésseis	59

3.5	Tratamentos dos biofilmes, em superfície de polipropileno com soluções sanificantes à base de óleos essenciais	60
4	DISCUSSÃO	62
5	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Cronobacter sakazakii é uma bactéria patogênica gram-negativa, com morfologia de bastonete, aeróbia facultativa, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Foi chamada de *Enterobacter cloacae*, antes de 1980 e, posteriormente, de *Enterobacter sakazakii*. Entretanto, em 2007, foi reclassificada para novo gênero, *Cronobacter* (IVERSEN et al., 2007).

Infecções associadas com significativa morbidade e mortalidade, principalmente entre recém-nascidos, têm sido associadas a *Cronobacter sakazakii*. As infecções causadas por *C. sakazakii* são importantes causas de risco de morte, podendo causar meningite, septicemia e enterocolite necrosante em lactentes. São mais comuns em recém-nascidos e bebês, entre os quais estão, geralmente, associados a mau prognóstico. Taxas de mortalidade entre 33% a 80% foram relatadas e infecções por *C. sakazakii* também estão associadas com morbidade significativa, podendo deixar sequelas graves (KIM et al., 2008).

O habitat natural de *C. sakazakii* é desconhecido, podendo ser encontrado no ambiente e nos alimentos. A literatura relata o isolamento de *C. sakazakii* de leite em pó, de produtos de queijo, de alimentos para bebês, de carne moída, de salsicha e de produtos hortícolas, significando alto risco de contaminação. Não se conhece ao certo a fonte de contaminação de fórmula infantil em pó (FIP), mas se sabe que ela pode ser intrínseca e extrínseca. Contaminação intrínseca é quando resulta da introdução do organismo no FIP, em algum momento, durante o processo de fabricação. Em contraste, a contaminação extrínseca pode resultar da utilização de utensílios contaminados, tais como misturadores e colheres, na preparação de FIP (GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005).

Lactentes e crianças pequenas são especialmente vulneráveis às infecções transmitidas por alimentos. Portanto, a segurança das crianças e o acompanhamento da qualidade microbiológica de fórmulas infantis são de extrema importância (KIM; KLUMPP; LOESSNER, 2007).

Cronobacter sakazakii apresenta capacidade de formação de biofilmes, os quais são constituídos por bactérias aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e envolvidas por camada de partículas de matéria orgânica, ou seja, depósitos nos quais os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, conhecida por exopolissacarídeos (EPS) (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007).

Quando microrganismos patogênicos e deterioradores participam do processo de formação de biofilme, podem contaminar produtos alimentícios, causando danos à saúde do consumidor e provocar grandes prejuízos econômicos (CHARACKLIS, 1990). Biofilmes formados por microrganismos patogênicos têm sido considerados de grande importância no contexto de segurança alimentar, despertando o interesse de inúmeros grupos de pesquisa (GANDARA; OLIVEIRA, 2000; SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009; ZOTOLLA; SASAHARA, 1994).

Devido à resistência apresentada por biofilmes a antissépticos convencionais e sanificantes, a demanda por novos antimicrobianos para o controle do mesmo tem aumento. Com isso, as atenções estão se voltando cada vez mais para o uso de compostos antimicrobianos naturais, o que instigou algumas investigações com relação aos efeitos de fitoquímicos. Entre esses estudos, há crescente pesquisa com relação aos óleos essenciais (CHORIANOPOULOS et al., 2008). A possível utilização de óleos essenciais como agentes antimicrobianos é assegurada pelo aumento na procura de produtos considerados como naturais.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii* e sobre biofilme em superfície de polipropileno.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter é um gênero da família Enterobacteriaceae cujas cepas, até 1980, eram nomeadas como *Enterobacter cloacae* (FARMER III et al., 1980). Em 2008, foi feita uma reclassificação de *Enterobacter sakazakii* como um novo gênero, *Cronobacter*, em que cinco espécies foram incluídas: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter muytjensii* e *Cronobacter dublinensis*. *C. sakazakii* é uma bactéria gram-negativa, móvel, não formadora de esporos, anaeróbica facultativa, ubíqua. Ela pode crescer ao longo de um amplo intervalo de temperaturas (6 a 47 °C) e é inativada a 70 °C (IVERSEN et al., 2008).

Cronobacter spp. pode causar doenças transmitidas por alimentos na forma de surtos ou casos esporádicos, tais como enterocolite necrosante, bacteremia e meningite em crianças (ACKER et al., 2001; BOWEN; BRADEN, 2006; GÜRTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005; SANTO; FORSYTHE, 2013). A septicemia neonatal, ou sepse, é caracterizada por sinais sistêmicos de infecção e sua principal complicação, nos recém-nascidos, é a meningite (CECCON et al., 1999). O mecanismo específico de virulência de *Cronobacter* é pouco conhecido, mas o microrganismo parece ter uma propensão a infectar o sistema nervoso central, causando meningite, cistos ou abscesso (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2004). Já a enterocolite necrosante neonatal (ECN) é caracterizada por necroses e pneumatoses intestinais, distensão abdominal, vômitos biliosos e hematoquezia, capaz de evoluir para peritonite, pneumoperitonite e choque (ACKER, 2001; VIEIRA; LOPES, 2003).

Esta bactéria tem sido implicada frequentemente em doença em recém-nascidos e crianças de três dias a quatro anos de idade. De 1958 até 2003, foram

relatados pelo menos 76 casos de infecções por *C. sakazakii* e 19 mortes em recém-nascidos e crianças (IVERSEN; FORSYTHE, 2003). Segundo o Center for Disease Control and Prevention - CDC (2011), normalmente, são informados cerca de quatro a seis casos de *Cronobacter* por ano. Mas houve aumento recente, tendo sido informado um total de 12 casos em 2011.

Embora os surtos causados por essa bactéria sejam escassos, as infecções por *C. sakazakii* são frequentemente acompanhadas por uma alta taxa de mortalidade de 40%-80%, em lactentes (KIM; RYU; BEUCHAT, 2006; LAI; DMD, 2001; LEHNER; STEPHAN, 2004), especialmente nos que apresentam baixo peso ao nascer ou neonatos imunocomprometidos. *Cronobacter sakazakii* tem sido isolada de inúmeras fontes alimentares, ambientais e clínicas, porém, fórmula infantil tem sido o principal veículo de transmissão deste microrganismo (GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005; IVERSEN; FORSYTHE, 2003; MULLANE et al., 2008). Por isso, vários estudos têm implicado fórmulas infantis em pó reidratadas como fonte de *C. sakazakii* em infecções em neonatos (ACKER et al., 2001; BLOCK et al., 2002; CLARK et al., 1990; HIMELRIGHT et al., 2002; NORIEGA et al., 1990; SIMMONS et al., 1989; SMEETS et al., 1998; WEIR, 2002). A Comissão do *Codex Alimentarius* (CAC) da Organização das Nações Unidas prevê regulamentações relevantes para FIP, como a de que *Cronobacter* spp. deve estar ausente em 30 amostras de 10 g de produtos acabados FIP (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - CAC, 2008). A União Europeia introduziu oficialmente padrões microbiológicos semelhantes (EUROPEAN COMMISSION, 2007).

O primeiro surto de *C. sakazakii* ligado à fórmula infantil em pó a partir de uma lata fechada foi em 2001 (CDC, 2002; HIMELRIGHT et al., 2002; WEIR, 2002). Em outro surto, a bactéria não foi encontrada no produto (leite em pó) e sim no misturador utilizado para preparar a fórmula reidratada (NORIEGA

et al., 1990). Sendo assim, sugeriu-se que a contaminação pode ter surgido a partir de lotes anteriores da fórmula para lactentes utilizada.

No Brasil, Santos (2006) avaliou 86 amostras de fórmula infantil em pó, 20 de fórmulas reconstituídas e 5 amostras de amido. Destas, em 12 (14%) amostras de fórmulas em pó e em 4 (80%) amostras de amido foi detectado *C. sakazakii*.

Santos et al. (2000) descreveram um surto de septicemia por *Cronobacter sakazakii* em sete pacientes (dois adultos, uma criança e quatro neonatos), em quatro unidades de terapia intensiva, durante setembro e outubro de 1998, em diferentes hospitais públicos do Rio de Janeiro. Os dois adultos vieram a falecer.

Barreira et al. (2003) relataram um caso de meningite por *C. sakazakii* atendido no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, acometendo um bebê de 14 dias, amamentado exclusivamente ao seio. Na cultura do líquido, foi detectada *C. sakazakii*, causando no recém-nascido um mal convulsivo, seguido de edema cerebral e extensa hemorragia, coma, abaulamento acentuado da fontanela e disjunção de suturas cranianas. Os autores não sugerem qual a causa da infecção.

Em estudo realizado em uma maternidade de um hospital em São Paulo, Brasil, foi avaliada a população de *Cronobacter sakazakii* e de enterobactérias em amostras de fórmula infantil em pó e reconstituídas, ambientes das cozinhas, água, mamadeiras, utensílios e mãos dos manipuladores. *C. sakazakii* foi encontrada em fórmula infantil em pó, em resíduos de uma mamadeira e em uma esponja utilizada no hospital (PALCICH et al., 2009).

As fórmulas infantis em pó têm sido consumidas com segurança por crianças há mais de 50 anos e constitui cerca de 80% do volume desse alimento consumido no mundo todo. Como não é um produto estéril, pode conter baixos

níveis de patógenos oportunistas, como, por exemplo, *C. sakazakii* (UNITED STATES OF AMERICA - USA, 2002).

A atividade de água (a_w) de fórmula infantil em pó é baixa, igual a 0,2, o que garante sua estabilidade (BREEUWER et al., 2003). Tem sido demonstrado que *C. sakazakii* tem resistência notável em meio seco por períodos de, pelo menos, dois anos (CAUBILLA-BARRON; IVERSEN; FORSYTHE, 2004). Esse recurso representa uma vantagem competitiva, facilitando a sua prevalência em produtos com baixo teor de água (EDELSON-MAMMEL; PORTEUS; BUCHANAM, 2005). *Cronobacter* spp. pode acumular solutos, tais como trealose, que protege o microrganismo contra o estresse osmótico, estabilizando a sua membrana (BREEUWER et al., 2003).

Kandhai et al. (2004), na Holanda, verificaram que *C. sakazakii* pode estar amplamente distribuído tanto no ambiente doméstico como no industrial (fabricas produtoras de leite em pó, massas, cereais, chocolate, farinha de batata e condimentos). O microrganismo foi isolado em 35 unidades de 147 amostras provenientes de 9 fábricas e em 16 casas avaliadas.

As indústrias de leite em pó, ou de fórmulas infantis, podem apresentar diferenças em vários aspectos, desde os materiais utilizados na sua construção, a idade da fábrica, o *design*, até a facilidade de limpeza do ambiente e isso pode influenciar diretamente o nível de eficiência do controle da contaminação microbiana no ambiente (GURTLER; KORNACKI; BEUCHAT, 2005).

Muytjens e Kollée (1990) associaram a contaminação de liquidificadores e de escovas utilizadas nas cozinhas com doenças infantis causadas por *C. sakazakii*. É importante ter um rigoroso controle de limpeza de equipamento e utensílios utilizados no preparo dessas fórmulas.

A presença de *C. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente de sua capacidade de aderir às superfícies e formar biofilmes. Iversen, Lane e Forsythe (2004) investigaram o potencial de cepas de *C.*

sakazakii em formar biofilme em materiais comumente encontrados tanto em ambiente industrial como doméstico, tais como silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável. A formação de biofilme foi verificada em todos os materiais.

Kim, Ryu e Beuchat (2006) demonstraram a formação de biofilme de *C. sakazakii* em aço inoxidável e em tubos de alimentação enteral, quando estes eram imersos em fórmula infantil. Já Iversen, Lane e Forsythe (2004) estudaram a capacidade de *C. sakazakii* se multiplicar, quando cultivada em fórmula infantil em temperatura de refrigeração e de formar biofilmes a 37 °C, em superfícies como látex, silicone e, em menor quantidade, no aço inoxidável.

A capacidade de *C. sakazakii* de formar biofilme, combinada à alta resistência ao estresse osmótico, pode favorecer a sua persistência no ambiente, após a colonização nos equipamentos utilizados no preparo dos alimentos (LEHNER; STEPHAN, 2004).

2.2 Biofilmes

Mais de 70 anos após o primeiro relatório sobre biofilmes (ZOBELL, 1943), eles ainda são uma preocupação em ampla gama de áreas e, especificamente, nas áreas de alimentos, ambiental e biomédica (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997; MAUKONEN et al., 2003; SIHORKAR; VYAS, 2001; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010; VERAN, 2002). O conceito de biofilme tem emergido gradualmente de estudos científicos durante longo período de tempo, porém, nas últimas duas décadas, essa concepção tem avançado consideravelmente.

Biofilme pode ser definido como uma comunidade de microrganismos sésseis embebidos em matriz polimérica extracelular (HARRISON; TURNER; CERI, 2005), caracterizada por células aderidas irreversivelmente a uma superfície ou interface e que exibem alteração fenotípica em relação ao

crescimento planctônico (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Representam a parte majoritária de toda a vida microbiana, tanto em quantidade como em termos de atividade (XAVIER et al., 2003).

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre não com células individualizadas crescendo de maneira planctônica (livres, em suspensão), mas como comunidades sésseis (células microbianas associadas a diversos tipos de superfícies), com diferentes graus de complexidade, em estruturas denominadas biofilmes (WATNICK; KOLTER, 2000; WEBB; GIVSKOVY; KJELLEBERG, 2003).

Os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais variados tipos de ambientes, sejam eles bióticos, como tecidos vegetais e animais, ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos. A opção por sua constituição está no fato de que estes, por meio da formulação de micro-habitats, oferecem proteção aos indivíduos que dele fazem parte contra as intempéries e estresses do meio ambiente (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; JOHNSON, 2007; MADDULA et al., 2006). Os biofilmes constituem uma barreira física, protegendo as células de inúmeros fatores de estresse ambiental, como luz ultravioleta (UV), estresse osmótico, calor, inanição, detergentes ácidos, antibióticos, fagócitos, anticorpos e bacteriófagos. Esta comunidade de células bacterianas fechadas, encerradas em uma matriz polimérica de produção própria e aderida a uma superfície viva ou inerte, constitui um modo protegido de crescimento que permite a sobrevivência em ambientes hostis (LEHNER et al., 2005).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), também chamada de glicocálix, é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007), determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas do biofilme (FLEMMING;

WINGENDER, 2010). Ainda que haja a predominância de polissacarídeos (WATNICK; KOLTER, 2000), ela também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas, ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico) e fosfolipídios (GUIBAUD et al., 2008).

As vantagens para que a célula bacteriana se encontre em biofilme são numerosas, nomeadamente no que diz respeito à proteção contra agentes agressivos, resistência a desinfetantes e antibióticos, à radiação UV (ELASRI; MILLER, 1999), à desidratação (a matriz de EPS é altamente hidratada) e a predadores, como protozoários (XAVIER et al., 2003).

Vários microrganismos deterioradores e patogênicos são capazes de aderir e formar biofilme em diversos tipos de superfícies. Na indústria de alimentos, o grupo de maior predominância é o das bactérias, cujas elevadas taxas de multiplicação, grande capacidade de adaptação e produção de substâncias e estruturas extracelulares as tornam aptas à formação de biofilme (CHARACKLIS, 1990; NITSCHKE; COSTA, 2007).

O processo de formação de biofilme é caracterizado por diferentes etapas (Figura 1).

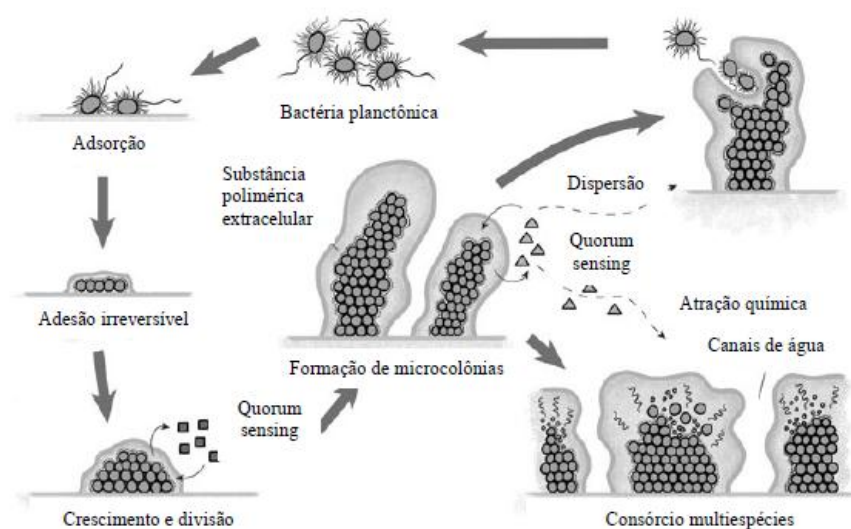


Figura 1 Formação de biofilme (HARRISON; TURNER; CERI, 2005)

Durante o primeiro estágio, moléculas orgânicas e inorgânicas presentes no meio circulante são transportadas até a superfície por intermédio de difusão ou fluxo turbulento; o acúmulo dessas substâncias à superfície, denominado de filme condicionante, representa importante papel na aderência bacteriana, uma vez que pode alterar as propriedades físico-químicas da superfície (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Nessa etapa, células planctônicas migram do meio líquido para a superfície condicionada, aderindo por meio de forças físicas (forças de Van der Waals e forças de Derjaguin, Verwey, Landau e Overbeek – DVLO, interações estéricas e eletrostáticas) e ou apêndices celulares (flagelo e, ou fimbria) (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

Na segunda etapa, um grande número de células aderidas reversivelmente permanece imobilizado e torna-se adsorvido irreversivelmente. Pili ou fímbrias e flagelos propiciam o contato da célula à superfície, estimulando reações químicas, tais como oxidação e hidratação. Vale ressaltar

que o processo de adesão pode ocorrer dentro de poucos minutos ou poucas horas. Na etapa seguinte ocorre a divisão celular, aumentando rapidamente a população. Nesse estágio, a presença de expolissacarídeos e de cátions divalentes propicia forte ligação entre as células, formando o biofilme maduro.

Outra interessante teoria é proposta por Shi e Zhu (2009), que abordaram a formação de biofilmes microbianos, enfatizando sua ocorrência em indústrias alimentícias. Segundo estes autores, a formação de biofilmes microbianos em ambiente de processamento de alimentos é um processo complexo. Inicialmente, moléculas orgânicas provenientes do alimento são depositadas sobre a superfície de equipamentos formando o filme condicionante. Em seguida, microrganismos ativos biologicamente aderem à superfície condicionada, atraídos pelas moléculas orgânicas. Algumas células microbianas persistem mesmo após a limpeza e a sanitização e iniciam o crescimento do biofilme. Por último, forma-se o biofilme maduro com a ajuda da expressão de genes específicos e *quorum sensing*. Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos são essenciais o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2006).

Os biofilmes maduros são ecossistemas altamente organizados em que canais de água encontram-se dispersos e fornecem passagem para a troca de nutrientes, metabólitos, oxigênio e produtos de excreção. A comunidade do biofilme pode compreender apenas uma espécie bacteriana ou múltiplas espécies, arrançadas em camadas únicas de células ou em estruturas tridimensionais (SAUER; RICKARD; DAVIES, 2007). Na etapa final, ou de morte, ocorre a produção de enzimas, que rompem partes do biofilme, que podem iniciar outro processo de adesão em substrato fresco (GARRETT; BHAKOO; ZHANG, 2008).

O crescimento não desejado de biofilmes tem impacto negativo em várias atividades. Estragos em equipamentos devido à biocorrosão, à

contaminação de produtos, às perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, à resistência acrescida a transferências de calor e às perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos do acúmulo de biofilmes microbianos e representam perdas significativas para indústrias, em âmbito global. Tais problemas são agravados pela resistência aumentada a métodos de desinfecção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparados com células bacterianas livres. Assim, os métodos convencionais de desinfecção não são suficientes e requerem, por vezes, doses elevadas de desinfetantes, indesejadas do ponto de vista ambiental (SIMÕES; PEREIRA; VIEIRA, 2003).

Os principais microrganismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos são as bactérias, pois atuam sobre numerosos tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH e condições do meio ambiente. Tendo em vista os problemas de resistência de microrganismos a antibióticos e desinfetantes convencionais, e diante da atual tendência do mercado de utilizar produtos ecologicamente seguros, o emprego de óleos essenciais para a conservação de alimentos e controle fitossanitário vem sendo muito estudado, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (PEREIRA et al., 2008; SACCHETTI, 2004).

Uma vez que os microrganismos formam biofilme maduro, a higienização torna-se muito mais difícil. Além disso, antimicrobianos não penetram satisfatoriamente na matriz exopolissacarídica e, assim, eles não matam todas as células do biofilme (WIRTANEN; SALO; HELANDER, 2001). Neste contexto, a investigação de novos produtos no controle de biofilmes demonstra elevada importância. Dentre as alternativas encontram-se os óleos essenciais.

2.3 Óleos essenciais

Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas apresentam o chamado metabolismo secundário. Os vegetais produzem grande variedade de compostos orgânicos, que não têm ação direta conhecida em seus processos vitais, como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Entre os metabólitos secundários podemos encontrar os óleos essenciais, que vêm ganhando espaço devido à sua utilização crescente nas áreas de alimentos (condimentos, antioxidantes, aromatizantes de alimentos e bebidas), cosméticos (perfumes e produtos de higiene), no controle de microrganismos, agindo como bactericidas, fungicidas e virucidas, e no controle de nematoides, insetos e parasitas (ALTOÉ, 2012).

Óleos essenciais são, geralmente, uma mistura complexa de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos. Ocorrem em todo o tecido vivo da planta, geralmente concentrados na casca, nas flores, no rizoma e nas sementes (ARAÚJO, 2011; BRITO, 2007).

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

Simões et al. (2007) definem os óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas, por meio de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos

cítricos. De maneira geral, são misturas de substâncias orgânicas voláteis, de consistência semelhante ao óleo, definida por um conjunto de propriedades, entre as quais se destacam volatilidade, aroma agradável e solubilidade em solventes orgânicos apolares, entre outras. Assim, diferem dos óleos fixos, que são misturas de triacilglicerídeos, obtidos geralmente de sementes. São, também, denominados de essências, óleos etéreos ou óleos voláteis. Quando recentemente extraídos, são incolores ou ligeiramente amarelados; alguns podem apresentar coloração intensa, como o óleo de camomila, que é azul intenso, devido à presença dos derivados do azuleno.

A intensidade de produção e a composição dos óleos variam de acordo com a espécie, a variabilidade genética, os fatores ambientais, sendo, geralmente, específicos para um determinado órgão e característicos para o estágio de desenvolvimento da planta. Podem ser consideradas moléculas lipofílicas, de baixo peso molecular, constituídas de uma ou mais insaturações, instáveis à temperatura e à luz, podendo ser degradadas ou sofrer polimerização (GUIMARÃES et al., 2008).

Os constituintes dos óleos essenciais são agrupados em duas classes quimicamente distintas: terpenoides e fenilpropanoides (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SANTOS, 2004). Nas células, os metabólitos secundários são sintetizados a partir do acetil-CoA, ácido chiquímico, ácido mevalônico e metileritrol fosfato, que são intermediários da via glicolítica (Figura 2). O acetil-CoA origina fenóis e sua formação ocorre a partir da descarboxilação oxidativa da quebra da molécula da glicose e da formação de duas moléculas de ácido pirúvico. O ácido chiquímico é sintetizado a partir da combinação de um intermediário da glicólise (fosfoenolpiruvato) com um componente da via da pentose-fosfato (eritrose-4-fosfato). Sua via leva à formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, que são precursores dos metabólitos secundários aromáticos, como alcaloides, ácido cinâmico,

fenilpropanoides e ligninas. A condensação de três moléculas de acetil-CoA origina o ácido mevalônico, enquanto, da combinação do piruvato com o gliceraldeído 3-fosfato (via glicolítica), forma-se o metileritrol fosfato. A via biossintética do metileritrol fosfato, juntamente com a via do mevalonato, origina os esteróis e os terpenoides (DEWICK, 2002; SANTOS, 2004).

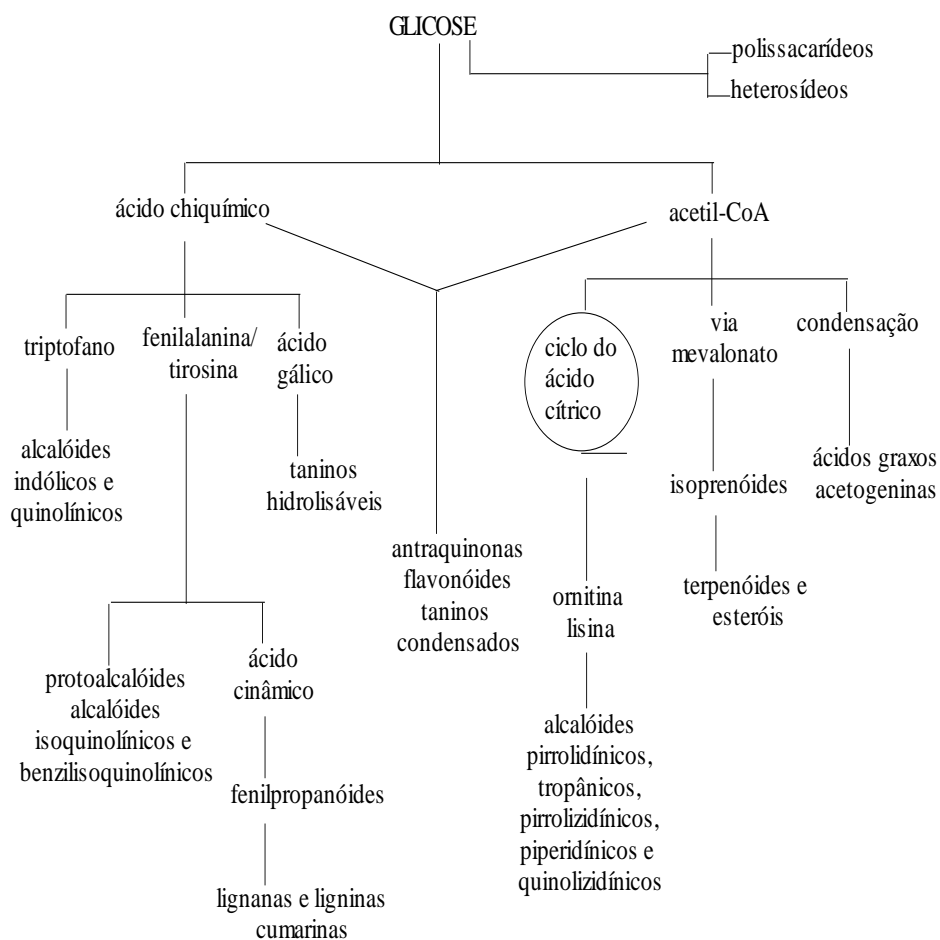


Figura 2 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários, adaptado de Simões et al. (2004)

Os óleos essenciais são constituídos por uma complexa mistura de compostos, incluindo terpenos, álcoois, cetonas, fenóis, ácidos, aldeídos e ésteres (AYALA-ZAVALA et al., 2007). Segundo Simões et al. (2004), esses constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços).

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, como hidrodestilação, maceração, extração por solvente, enfleurage, CO₂ supercrítico e micro-ondas. Dentre esses, o método de maior aplicação é o de hidrodestilação, que se divide em duas técnicas, arraste com vapor de água e coobação, que é a destilação repetida, a fim de se obter maior concentração dos princípios ativos (SANTOS, 2004).

Há diversos fatores que influenciam a produção de óleo pelas plantas e sua constituição química (Figura 3). Gobbo Neto e Lopes (2007) citam fatores como o genético, a sazonalidade, o ritmo circadiano, a idade, o estágio de desenvolvimento da planta, a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, a nutrição mineral, a altitude, a poluição atmosférica, a indução por estímulos mecânicos e o ataque de patógenos. Não há um comportamento similar entre as plantas, para a variação de cada item; como exemplo, a espécie *Thymus pulegioides* L. produz o máximo teor de óleo e de seu componente de interesse, se for coletada durante ou logo após a floração (SENATORE, 1996); já na espécie *Osmanthus fragrans* Lour, o teor de óleo será maior se a mesma for coletada no início do estágio de floração (WANG et al., 2009).

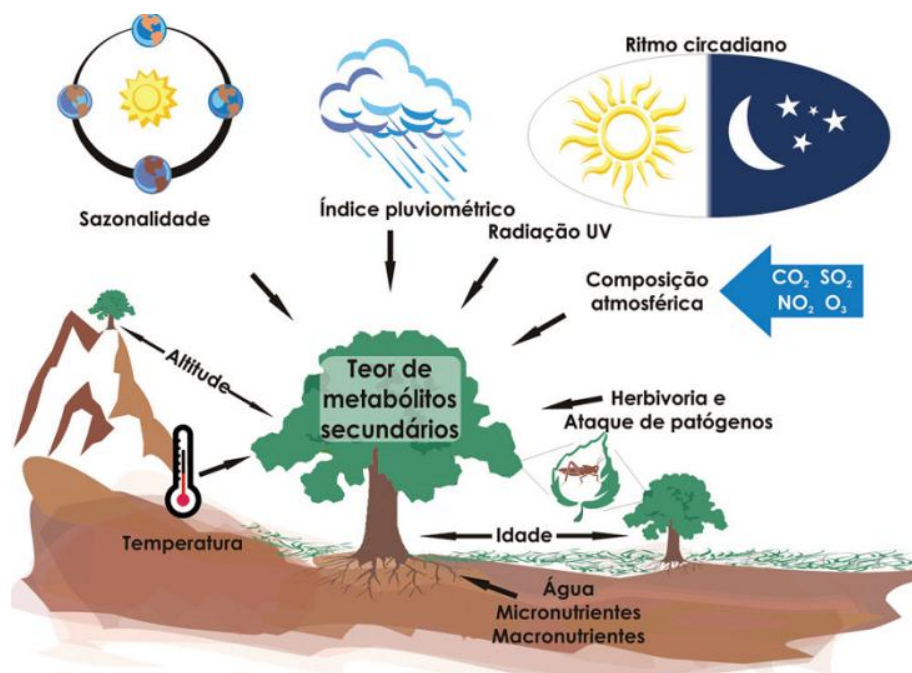


Figura 3 Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta

Fonte: Gobbo Neto e Lopes (2007)

Há, ainda, os fatores relacionados ao processo de colheita do material vegetal e de extração do óleo essencial, que podem interferir diretamente no seu rendimento. Souza et al. (2011) notaram que o horário de coleta interfere no rendimento de óleo essencial para a espécie *Cordia verbenacea* DC. Em dias chuvosos, de maneira geral, o rendimento de óleo essencial é reduzido, para a maioria das espécies (GOBBO NETO; LOPES, 2007). Teles et al. (2012) verificaram que há diferenças no rendimento de óleo essencial e na composição química deste, em amostras de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown processadas frescas ou submetidas a método de secagem.

2.4 Ação antibacteriana dos óleos essenciais

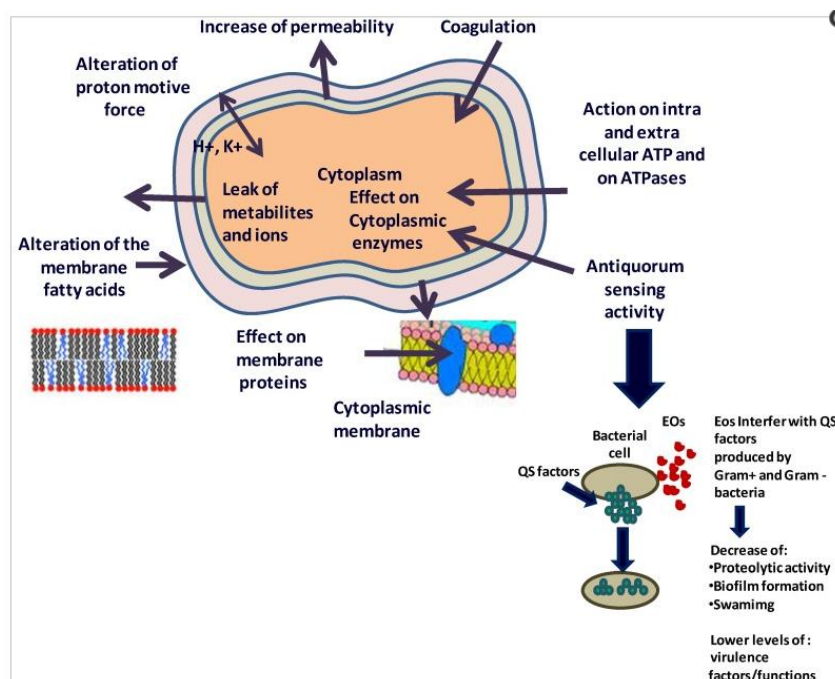
As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa para as exigências dos consumidores, quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (TASSOU; KOUTSOUMANIS; NYCHAS, 2000).

Considerando que os óleos essenciais são formados por diversos constituintes, torna-se difícil atribuir a eficácia da atividade antimicrobiana a apenas um deles. O mecanismo de ação de um dado constituinte pode diferir, quando comparado ao de outros, sendo relatados vários alvos na célula microbiana (AYALA-ZAVALA; GONZÁLEZ-AGUILAR; DEL-TORO-SÁNCHEZ, 2009). A interação inicial entre os componentes dos óleos essenciais e a célula microbiana parece ser a difusão passiva da molécula componente, por meio da parede celular de bactérias gram-positivas e fungos ou membrana externa de bactérias gram-negativas (HAMMER; CARSON, 2011). Contudo, pode ocorrer, também, interação de constituintes dos óleos essenciais com a membrana externa de bactérias gram-negativas, conforme demonstrado por La Storia et al. (2011), que utilizaram carvacrol contra diferentes espécies bacterianas.

Óleos essenciais são compostos tipicamente lipofílicos e, por isso, são capazes de passar pela parede celular e se acumular na membrana citoplasmática bacteriana, causando aumento da permeabilidade, por danificar a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípídeos (BAKKALI et al., 2008). O aumento da fluidez da membrana parece estar entre os primeiros efeitos antimicrobianos causados pelo tratamento com óleos essenciais. A expansão e o aumento da fluidez da membrana citoplasmática podem levar à quebra da integridade com consequente perda de pequenos componentes intracelulares, como hidrogênio, potássio e sódio. A perda destes íons está

associada ao decréscimo do potencial de membrana, pH intracelular e *pool* de ATP, causado pelo dano ao gradiente de íons que ocorre entre o interior e exterior da célula. Concentrações elevadas de óleos essenciais ou longos tempos de exposição podem acarretar danos maiores à membrana citoplasmática, ocasionando perda de macromoléculas, como DNA e proteínas, estritamente relacionadas à morte celular (HAMMER; CARSON, 2011).

Ainda, segundo Ayala-Zavala, González-Aguilar e Del-Toro-Sánchez (2009) e Burt (2004), o mecanismo de ação dos óleos essenciais, fenômeno complexo e diversificado, pode incluir destruição da parede celular e membrana citoplasmática, danificação de proteínas de membrana, liberação de conteúdo celular, coagulação do citoplasma, depleção da força próton motiva, inativação de enzimas essenciais e perturbação da funcionalidade do material genético. Os principais mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana, bem como os locais onde estes ocorrem, encontram-se ilustrados na Figura 4.



Figuras 4 Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana (NAZZARO et al., 2013)

Em estudo realizado por Amalaradjou e Venkitanarayanan (2011), o biofilme de *C. sakazakii*, formado sobre superfícies abióticas, foi inibido e inativado por trans-cinamaldeído.

O mecanismo de ação pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antibacteriano envolve a parede celular bacteriana, em que os óleos essenciais desnaturam e coagulam proteínas. Mais especificamente, eles atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons hidrogênio (H⁺) e potássio (K⁺). A alteração dos gradientes de íons conduz ao comprometimento dos processos vitais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, processo de fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e,

consequentemente, na morte do microrganismo (DORMAN; DEANS, 2000 citados por BONA et al., 2012).

A ação inibitória das especiarias e de seus óleos nos diferentes microrganismos tem sido relatada em diversos estudos (OATTARA et al., 1997). O interesse renovado no uso de especiarias como agentes antibacterianos é atribuído, basicamente, a duas razões: a segurança dos aditivos químicos é constantemente questionada, havendo uma tendência ao uso de substâncias naturais de plantas, e a redução do sal ou do açúcar em alimentos por razões dietéticas tende a aumentar o uso de outros temperos (ISMAIEL; PIERSON, 1990).

Além dos recentes estudos da manipulação de óleos com ação antimicrobiana, têm-se avaliado diferentes misturas de óleos essenciais, a fim de comprovar os seus níveis de sinergismo ou antagonismo, visto que não se pode afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica, podendo haver a interação entre os diferentes componentes do óleo. Além disso, o estudo dessas misturas de óleos tem a finalidade de maximizar a atividade e minimizar as concentrações para não haver interferência diante das características sensoriais dos alimentos, bem como se podem constituir bases para a produção de conservantes de alimentos naturais (NGUEFACK et al., 2012).

REFERÊNCIAS

ACKER, J. V. van et al. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *E. sakazakii* in powdered milk formula. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 1, p. 293-297, 2001.

ALTOÉ, T. F. **Sustentabilidade de plantações de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish) na produção e qualidade de óleo essencial**. 2012. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

AMALARADJOU, M. A. R.; VENKITANARAYANAN, K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 74, n. 2, p. 200-208, Feb. 2011.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 478 p.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5. ed. Viçosa, MG: UFV, 2011. 601 p.

AYALA-ZAVALA, J. F. et al. Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils. **Journal of Food Science**, Malden, v. 74, n. 7, p. R84-R91, Sept. 2009.

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

BARREIRA, E. R. et al. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de um caso. **Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1/2, p. 65-70, 2003.

BLOCK, C. et al. Cluster of Neonatal infections in Jerusalem due to unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 21, n. 8, p. 613-616, Aug. 2002.

BONA, T. D. M. M. et al. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 411-418, maio 2012.

BOWEN, A. B.; BRADEN, C. R. Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 12, n. 8, p. 1185-1189, Aug. 2006.

BREEUWER, P. et al. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 967-973, Nov. 2003.

BRITO, A. M. G. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.** 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2007.

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

CAUBILLA-BARRON, J.; IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. J. The desiccation survival of *Enterobacter sakazakii* and related Enterobacteriaceae. **American Society for Microbiology**, New Orleans, v. 3, p. 23-27, May 2004.

CECCON, M. E. J. et al. Sepsis neonatal: análise comparativa entre duas décadas (1977-1987 e 1988-1998) em relação à incidência dos agentes etiológicos e da morbimortalidade. **Pediatria**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 287-297, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula. Tennessee, 2001. 300 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **FDA and CDC update:** investigation of Cronobacter bacteria illness in infants. Tennessee, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/media/releases/2011/s1230_Cronobacter.html>. Acesso em: 10 nov. 2014.

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

CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bacteria effect of essential oil and hydrosol of *Stureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, Dec. 2008.

CLARK, N. C. et al. Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 13, p. 467-472, 1990.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children**. Rome: FAO, 2008.

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.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products:** a biosynthetic approach. 2nd ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

EDELSON-MAMMEL, S. G.; PORTEOUS, M. K.; BUCHANAN, R. L. Survival of *E. sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 9, p. 1900-1902, Sept. 2005.

ELASRI, M. O.; MILLER, R. V. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 5, p. 2025-2031, May 1999.

EUROPEAN COMMISSION. **Commission regulation n° 1441/2007**: OJ L322, of 5 december 2007 amending regulation n° 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Geneva, 2007.

FARMER III, J. J. et al. *Enterobacter sakazakii*: uma nova espécie de "Enterobacteriaceae" isolado de amostras clínicas. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 30, n. 3, p. 569-584, 1980.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, p. 7945-7947, Nov. 2007.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 623-633, Aug. 2010.

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

GANDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 1-7, abr. 2000.

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

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

GUIBAUD, G. et al. Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. **Colloids and Surfaces**, Washington, v. 63, p. 48-54, May 2008.

GUIMARÃES, L. G. de L. et al. Influência de luz e temperatura na oxidação de óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2008.

GURTLER, J. B.; KORNACKI, J. L.; BEUCHAT, L. R. *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 1-34, Sept. 2005.

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

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

HIMELRIGHT, I. et al. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula-Tennessee, 2001. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v. 287, n. 14, p. 2204-2205, 2002.

ISMAIEL, A.; PIERSON, M. D. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 6, p. 1676-1678, 1990.

IVERSEN, C. et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov. comb. nov., *C. malonaticus* sp. nov., *C. turicensis* sp. nov., *C. muytjensii* sp. nov., *C. dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *dublinensis* subsp. nov., *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *C. dublinensis* sp. nov. subsp. *lactaridi* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, London, v. 58, n. 6, p. 1442-1447, June 2008.

IVERSEN, C. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov. *Cronobacter sakazakii* nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, p. 1-11, Apr. 2007.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 14, n. 11, p. 443-454, 2003.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 378-382, 2004.

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.

KANDHAI, M. C. et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **Lancet**, London, v. 363, n. 9402, p. 39-40, Jan. 2004.

KIM, H.; RYU, J. H.; BEUCHAT, L. R. Survival of *Enterobacter sakazakii* on fresh produce as affected by temperature, and effectiveness of sanitizers for its elimination. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 134-143, Sept. 2006.

KIM, K. et al. Prevalence and genetic diversity of *Enterobacter sakazakii* in ingredients of infant foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 196-203, Sept. 2008.

KIM, K. P.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M. J. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 1/2, p. 195-203, Feb. 2007.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, Paris, v. 162, n. 2, p. 164-172, Feb./Mar. 2001.

LAI, K. K.; DMD, M. D. *Enterobacter sakazakii* Infection among neonates, infants, children and adults: case reports and review of the literature. **Medicine**, London, v. 80, n. 2, p. 113-122, Mar. 2001.

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

LEHNER, A.; STEPHAN, R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 12, p. 2850-2857, 2004.

MADDULA, V. S. R. K. et al. Quorum sensing and phenazine 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.

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

MULLANE, N. et al. Dissemination of *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) in a powdered milk production manufacturing facility. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 19, p. 5913-5917, Oct. 2008.

MUYTJENS, H. L.; KOLLÉE, L. A. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? **Pediatric Infectious Disease**, Baltimore, v. 9, p. 372-373, 1990.

NAZZARO, F. et al. Efeito de óleos essenciais sobre bactérias patogênicas. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

NGUEFACK, A. J. et al. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 2, p. 377-383, 2012.

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

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 252-259, May 2007.

NORIEGA, F. R. et al. Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 9, p. 447-449, 1990.

OATTARA, B. et al. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 2/3, p. 155-162, 1997.

PALCICH, G. et al. *Enterobacter sakazakii* in dried infant formulas and milk kitchens of maternity wards in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 37-42, 2009.

PALMER, J.; FLINT, S. H.; BROOKS, J. D. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, Hampshire, v. 34, n. 9, p. 577-588, Sept. 2007.

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

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327 p.

SACCHETTI, G. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 621-632, 2004.

SANTO, O.; FORSYTHE, S. J. Cronobacter espécies como causas emergentes de infecções associadas aos cuidados de saúde. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 86, n. 3, p. 169-177, Mar. 2013.

SANTOS, M. et al. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 21, n. 2, p. 140, 2000.

SANTOS, R. F. S. **Ocorrência de *Enterobacter sakazakii* em fórmulas infantis para lactentes em hospital e maternidades da região de Campinas/SP.** 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 403-434.

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

SENATORE, F. Influência da colheita tempo sobre a produção e composição do óleo essencial de um tomilho (*Thymus pulegioides L.*) que cresce selvagem em Campania, sul da Itália. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 5, p. 1327-1332, 1996.

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

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

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

SIMMONS, B. P. et al. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 10, p. 398-401, 1989.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. 475 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. 1104 p.

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

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

SMEETS, L. C. et al. Genetische karakterisatie van *Enterobacter sakazakii* isolaten van Nederlandse patiënten met neonatale meningitis. *Ned. Tijdschr. Medical Microbiology*, London, v. 6, n. 5, p. 113-115, Dec. 1998.

SOUZA, M. F. et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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

TELES, S. et al. Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 247-252, 2012.

UNITED STATES OF AMERICA. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Health professionals letter on *Enterobacter sakazakii* Infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units.** Washington, 2002.
Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

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

VIEIRA, M. T. C.; LOPES, J. M. de A. Fatores associados à enterocolite necrosante. **Journal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 79, n. 2, p. 159-164, abr. 2003.

WANG, L. et al. Variations in the components of *Osmanthus fragrans* Lour. essential oil at different stages of flowering. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, n. 1, p. 233-236, May 2009.

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

WEBB, J. S.; GIVSKOVY, M.; KJELLEBERG, S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 578-585, Dec. 2003.

WEIR, E. Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 166, n. 1570, p. 1570, June 2002.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii*, and other microorganism in powdered infant formula**. Geneva, 2004. Disponível em:
<<http://www.who.int./foodsafety/micro/meetings/feb2004/em>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 76, p. 1-12, abr. 2003.

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

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

CAPÍTULO 2

Ação de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii*

1 INTRODUÇÃO

Cronobacter sakazakii é uma bactéria gram-negativa, em forma de bastão, pertencente à família Enterobacteriaceae. Esta espécie não faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal humano ou animal e é reconhecida como um potencial patógeno emergente de origem alimentar (FARBER, 2004).

O reservatório natural de *C. sakazakii* é ainda desconhecido, entretanto, outros membros do mesmo gênero são, normalmente, encontrados em fezes humanas e animais, no esgoto, na água e no solo (SAKAZAKI, 1974). Relatos demonstram que o microrganismo pode ser isolado em diversos tipos de ambientes e alimentos (IVERSEN; FORSYTHE, 2004; KANDHAI et al., 2004; LECLERCQ; WANEGUE; BAYLAC, 2002; MUYTJENS; KOLLÉE, 1990). De maneira geral, são considerados patógenos oportunistas que raramente causam doença em indivíduos saudáveis. *C. sakazakii*, no entanto, tem sido relacionado a diversos surtos e casos esporádicos de doenças envolvendo neonatos debilitados. Por esta razão, este microrganismo vem ganhando atenção de autoridades de saúde pública em diversos países (LAI; DMD, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2004).

A presença de *C. sakazakii* em equipamentos e utensílios pode ser decorrente de sua capacidade de aderir às superfícies e formar biofilmes. Iversen et al. (2004) investigaram o potencial de cepas de *C. sakazakii* em formar biofilme em materiais comumente encontrados tanto em ambiente industrial

como doméstico, tais como silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável. A formação de biofilme foi verificada em todos os materiais.

Sabe-se que os biofilmes têm um impacto negativo em várias atividades. Estragos em equipamentos por biocorrosão, entupimento de membranas e filtros e perdas energéticas relacionadas com o aumento do atrito são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos e representam perdas significativas para a indústria em âmbito global (WALKER et al., 2000).

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

Devido às altas taxas de mortalidade de bebês em decorrência de infecções causadas por *C. sakazakii* e sua capacidade de formação de biofilme, a busca por compostos antimicrobianos naturais, como óleos essenciais torna-se interessante. Dessa forma, buscou-se determinar a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Cronobacter sakazakii*, bem como frente a biofilme formado em polipropileno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de execução do experimento

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Composição e obtenção dos óleos essenciais

A composição dos óleos essenciais (OE) é apresentada na Tabela 1, conforme especificado pelo fornecedor.

Tabela 1 Composição dos óleos essenciais utilizados

Óleo	Nome científico	Compostos
Canela	<i>Cinnamomum cassia</i>	Aldeído cinâmico (81%), cumarina (3%), benzaldeído (3%), álcool cinâmico (3%), estireno (3%).
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol (71%), timol (3%), gama-terpineno (4,5%), para-cimeno (3,5%), beta-carfiofileno (4%).
Menta	<i>Mentha piperita</i>	l-mentol (34%), mentona (25%), acetato de mentila (5%), eucaliptol (9%).
<i>Litsea cubeba</i>	<i>Litsea cubeba</i>	Neral (30 %), geraniale (38%), limonene (11%).
Funcho-doce	<i>Foeniculum vulgare</i>	Não informado
Ho wood	<i>Cinnamomum camphora</i>	Linalol (98 %).
Anis-estrelado	<i>Illicium verum</i>	Anetol (mínimo 80%).
Noz-moscada	<i>Myristica fragans</i>	Alfa-pineno (20%), beta-pineno (14%), sabineno (17%), terpineno-4-ol (6%).
Tomilho-branco	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol (quantidade não especificada)
Mandarina	<i>Citrus nobilis</i>	Não informado
Cravo-botão	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Eugenol (84%), beta-cariofileno (6%) acetato eugenila (8%).
Basilicão	<i>Ocimum basilicum</i>	Metilchavicol (84%).

Todos os óleos foram adquiridos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda. (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil).

2.3 Sanificante controle

Foi utilizado o sanificante Sandet 666 (quaternário de amônio, nonil fenol etoxilado 9,5 moles OE, sequestrante, corante e veículo), adquirido da empresa Sandet Química Ltda.

2.4 Microrganismo, estocagem e padronização do inóculo

O microrganismo utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi *Cronobacter sakazakii* ATCC 29004, adquirido da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A cultura estoque foi armazenada em meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3g), NaCl (5 g), H₂O (1.000 mL) pH 7,2±7,4]. A cultura foi descongelada à temperatura ambiente e reativada inoculando-se alíquotas de 100 µL em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (*brain heart infusion*) e incubada, a 37 °C, por 24 horas. A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação, alíquotas de 50µL do inóculo foram transferidas para 300 mL de TSB (caldo triptona de soja) e incubadas a 37 °C, sendo realizadas leituras periódicas da absorbância (D.O. 600nm) e plaqueamento em TSA (ágar triptona de soja) com incubação a 37 °C/24 horas. A cultura foi padronizada em 10⁸ UFC mL⁻¹, com absorbância de 660 nm.

2.5 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB) de óleos essenciais sobre células planctônicas

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

Para tanto, 168 µL de TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 foram adicionados em cada cavidade da placa de microdiluição. Em seguida, 32 µL de óleo essencial foram acrescidos às cavidades correspondentes à coluna 1 e linha A, transferindo-se 100 µL para a linha seguinte após a homogeneização e assim

sucessivamente, desprezando-se os 100 μL finais, obtendo-se, assim, as seguintes concentrações finais (%): 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,0 e 16,00 (v/v). Foram adicionados nas cavidades 10 μL da cultura padronizada. As placas foram vedadas e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de alíquotas das culturas em TSA e incubadas a 37 °C/24 horas, determinando-se, assim, a concentração mínima bactericida (CMB) do óleo essencial.

O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições. Foi realizado um tratamento controle, contendo TSB acrescido de 0,5% de Tween 80 e inóculo.

2.6 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB_B) de óleos essenciais sobre células sésseis

Os biofilmes de *C. sakazakii* foram formados em microplacas de poliestireno com 96 cavidades. Nas cavidades foram adicionados 150 μL de TSB e 50 μL da cultura padronizada; as placas foram vedadas e incubadas a 37 °C/48 horas. Após esse período, as culturas foram removidas e as cavidades lavadas três vezes com solução salina 0,85% (m/v), para a remoção das células não aderidas. Após a lavagem, 200 μL das soluções dos óleos essenciais de canela, menta e ho wood, que foram selecionados por apresentarem melhores resultados sobre as células planctônicas, nas concentrações (%) de 0,00; 0,12; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 8,0 e 16,00 (v/v), foram adicionadas às cavidades. As soluções foram preparadas pela homogeneização vigorosa, por 2 minutos, em agitador tipo vórtex dos óleos essenciais em água destilada estéril acrescentada de 0,5% (v/v) de Tween 80. Após 20 minutos de contato, as soluções antimicrobianas foram removidas das cavidades, que foram lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, 200 μL de TSB foram adicionados às cavidades

e a microplaca foi incubada, a 37 °C/24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento das culturas em TSA e incubadas, a 37 °C/24 horas e determinadas as concentrações de óleos essenciais capazes de matar o biofilme, sendo essa considerada a concentração mínima bactericida do biofilme (CMB_B). O experimento foi conduzido em triplicata e três repetições.

2.7 Estudo do sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais sobre células planctônicas

Para o estudo do sinergismo dos óleos essenciais foram selecionados aqueles que apresentaram as menores concentrações mínimas bactericidas (CMB), sendo eles: canela, ho wood e menta. O estudo foi realizado empregando-se a combinação dos três óleos em diferentes proporções que estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Planejamento experimental para avaliação da ação antimicrobiana sinérgica da combinação dos óleos essenciais de canela, ho wood e menta

Ensaio	Óleo A	Óleo B	Óleo C
1	100	-	-
2	-	100	-
3	-	-	100
4	50	50	-
5	50	-	50
6	-	50	50
7	67	17	17
8	17	67	17
9	17	17	67
10	33	33	33

100 refere-se à CMB e CMB_B de cada óleo essencial estudado e os demais números representam as proporções dos óleos que foram utilizados

O efeito bactericida da combinação entre os óleos essenciais foi estabelecido utilizando-se a metodologia em tubos, com série de 11 tubos de ensaio, adicionados de 10 mL de TSB contendo 0,5 % de Tween 80. Os tubos foram autoclavados, a 121 °C, por 15 minutos. Os óleos essenciais foram diluídos diretamente neste caldo, nas concentrações demonstradas no planejamento experimental (Tabela 2). O tubo de número 11 foi considerado o controle positivo (TSB + inóculo). Cada tubo foi adicionado de 1 mL do inóculo padronizado. O conteúdo foi homogeneizado e os tubos incubados, a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, alíquotas foram plaqueadas em TSA, empregando-se a técnica de plaqueamento em superfície e incubadas, a 37 °C, por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata e três repetições.

2.8 Estudo do sinergismo antimicrobiano entre os óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis

Após formação dos biofilmes *C. sakazakii* em microplacas de poliestireno, como mencionado anteriormente, eles foram expostos às diferentes combinações dos óleos essenciais (Tabela 2).

Após a lavagem, 200 µL das soluções dos óleos essenciais foram adicionados às cavidades. As soluções dos óleos foram previamente preparadas pela homogeneização vigorosa em agitador tipo vórtex, por 2 minutos, em água destilada estéril acrescentada de 0,5% (v/v) de Tween 80. Após 20 minutos de contato, as soluções antimicrobianas foram removidas das cavidades, que foram lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, 200 µL de TSB foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada, a 37 °C/24 horas. Após esse período, foi realizado o plaqueamento das culturas em TSA e elas foram incubadas, a 37 °C/24 horas. A concentração mínima bactericida do biofilme (CMB_B) foi definida como a combinação dos óleos essenciais capaz de inibir o

crescimento bacteriano, o que caracteriza a inativação das células sésseis presentes no biofilme. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições.

2.8 Formação de biofilme bacteriano em superfície de polipropileno

2.8.1 Higienização dos cupons

A adesão bacteriana foi realizada em cupons de polipropileno com 1 mm de espessura e dimensões de 10 x 20 mm.

Os cupons foram lavados por imersão em detergente neutro líquido, enxaguados com água destilada estéril, imersos em solução comercial de ácido peracético 0,3%, por 30 minutos, sob agitação de 50 rpm a 50 °C. Em seguida, foram imersos em água destilada estéril, à temperatura de 80 °C, por 5 minutos e à temperatura ambiente, por 1 minuto, sob agitação de 50 rpm. Os cupons foram secos em estufa de secagem, a 40 °C, por 2 horas, de acordo com Oulahal et al. (2008) com modificações.

2.8.2 Adesão das células bacterianas e avaliação da biotransferência

Em uma placa de Petri de 140 mm de diâmetro, contendo 15 cupons, foram adicionados 60 mL de leite desnatado UHT e inoculados 10^8 UFC/mL da cultura de *Cronobacter sakazakii* padronizada. As placas foram incubadas a 37 °C, sob agitação branda (50 rpm), por 48 horas.

2.8.3 Enumeração das células em biofilme

Para a enumeração das células em biofilme, após 48 horas de incubação, foram retirados cupons da placa de Petri, os quais foram lavados com água peptonada, para a eliminação de células não aderidas. Em seguida, as células em biofilme foram removidas utilizando-se swab estéril. Após esse procedimento, foi realizada a diluição seriada e contagem do número de células viáveis determinadas em TSA, empregando-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas, e o resultado da contagem de colônias expresso em UFC/cm². Todo o experimento foi realizado em três repetições e as análises, em triplicata.

2.9 Preparo das soluções sanificantes

Para a realização do teste de sensibilidade do biofilme, foram formuladas diferentes soluções, como mostrado na Tabela 3. A solução controle 1 continha água destilada estéril e 0,5 de Tween 80; a solução controle 2, Sandet 666 e as soluções 1 e 2 contendo água destilada estéril, 0,5% de Tween 80 e óleos essenciais.

Tabela 3 Composição das soluções sanificantes

Soluções	Óleo essencial %(v/v)			Sandet 666
	Canela	Ho wood	Menta	
Controle 1	-	-	-	-
Controle 2	-	-	-	3%
1	0,67	0,34	0,17	-
2	0,33	0,66	0,33	-

As concentrações de óleos essenciais utilizadas foram definidas baseando-se nos resultados de atividade antimicrobiana sinérgica entre os óleos essenciais sobre as células sésseis

2.10 Tratamento do biofilme com soluções sanificantes contendo óleos essenciais em diferentes tempos de contato

Após 48 horas de formação de biofilme, os cupons foram retirados das placas de Petri, lavados com água peptonada 0,1% (m/v), por 5 vezes, para a eliminação de células não aderidas e imersos em solução sanificantes (Tabela 3), por 10 e 20 minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de sanificação, foi realizado esfregão sobre os cupons, com auxílio de swab de algodão estéril. Os swabs foram transferidos para tubos contendo água peptonada 0,1% (m/v), sendo, em seguida, agitados em vórtex, por 2 minutos. Após esse procedimento, realizou-se a diluição seriada e alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para placas contendo TSA, para a determinação do número de células viáveis. Empregou-se a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C/ 24 horas, sendo realizada, ao final desse período, a contagem padrão em placas e o resultado expresso em UFC/cm².

2.11 Delineamento experimental e análise estatística

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 2 (tratamentos x tempos de contato), com três repetições e a variável resposta foi o Log de redução, obtido pela diferença entre o biofilme formado após 48 horas e os tratamentos empregados. Após a realização de análise de variância, foi empregado o teste t (LSD) para a determinação da diferença entre as médias.

3 RESULTADOS

3.1 Concentração mínima bactericida dos óleos essenciais sobre células planctônicas de *C. sakazakii*

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de canela, orégano, menta, litsea, ho wood, tomilho, cravo, basilicão, funcho-doce, noz-moscada, anis-estrelado e mandarina sobre as células planctônicas de *Cronobacter sakazakii* é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 Concentração mínima bactericida (CMB) dos óleos essenciais sobre células planctônicas de *Cronobacter sakazakii*

Óleo essencial	Concentração %(v/v)
Canela	0,12
Orégano	0,25
Menta	0,25
Litsea	0,25
Ho wood	0,25
Tomilho	0,50
Cravo	0,50
Basilicão	1,00
Funcho-doce	2,00
Noz-moscada	2,00
Anis-estrelado	4,00
Mandarina	16,0

Os resultados apontam que os óleos essenciais apresentaram atividade bactericida em diferentes concentrações. O óleo essencial de canela a 0,125% (v/v) foi mais eficaz sobre as células planctônicas. Não foram encontradas diferenças entre as atividades bactericidas dos óleos de orégano, menta, litsea e ho wood, pois a concentração 0,25% (v/v) foi eficiente para inibir totalmente o desenvolvimento da bactéria. Os óleos de tomilho e cravo apresentaram CMB 0,5%(v/v). *C. sakazakii* mostrou menor sensibilidade aos óleos de basilicão a

1%, funcho-doce e noz-moscada a 2%, anis-estrelado a 4% e mandarina a 16% (v/v).

Após a definição das concentrações mínimas bactericidas foi realizado o teste do sinergismo dos óleos essenciais.

3.2 Sinergismos entre os óleos essenciais nas células planctônicas

Dentre os óleos essenciais testados, foram selecionados os de canela, menta e ho wood, por apresentarem menores concentrações mínimas bactericidas. Estes óleos foram testados em diferentes combinações, seguindo o planejamento experimental proposto na Tabela 2. Pode-se observar que o crescimento bacteriano foi inibido em todos os ensaios. A ação antimicrobiana é demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5 Concentração mínima bactericida das combinações de óleos essenciais de canela, howood e menta, utilizados nas análises de sinergismo sobre *Cronobacter sakazakii*

Ensaio	Óleo essencial % (v/v)			Resultados
	Canela	Ho wood	Menta	
1	0,12	-	-	(-)
2	-	0,25	-	(-)
3	-	-	0,25	(-)
4	0,06	0,12	-	(-)
5	0,06	-	0,12	(-)
6	-	0,12	0,12	(-)
7	0,08	0,04	0,04	(-)
8	0,02	0,16	0,04	(-)
9	0,02	0,04	0,16	(-)
10	0,04	0,08	0,08	(-)

(-) ausência de crescimento em todas as combinações testadas

3.3 Concentração mínima bactericida nas células sésseis

Após a determinação das CMB nas células planctônicas, foi realizado teste para definição da CMB nas células sésseis. Foram testados os óleos que apresentaram melhores resultados sobre as células planctônicas, canela, ho wood e menta. Na Tabela 6 encontra-se o teste dos óleos sobre as células sésseis de *Cronobacter sakazakii*.

Tabela 6 Concentração mínima bactericida dos óleos essenciais sobre de células sésseis de *Cronobacter sakazakii*

Óleo essencial	Concentração % (v/v)
Canela	1,00%
Menta	1,00%
Ho wood	2,00%

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, os óleos de canela e menta apresentaram CMB de 1%, seguido do óleo de wo hood, com 2% (v/v).

3.4 Sinergismos entre os óleos essenciais nas células sésseis

Na Tabela 7 são apresentados as concentrações testadas e os resultados do estudo do sinergismo dos óleos de canela, ho wood e menta sobre células sésseis de *Cronobacter sakazakii*. Não foi observado crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 7 Concentração mínima bactericida das combinações de óleos essenciais de canela, howood e menta, utilizados nas análises de sinergismo sobre células sésseis de *Cronobacter sakazakii*

Ensaio	Óleo essencial %(v/v)			Resultados
	Canela	Ho wood	Menta	
1	1	-	-	(-)
2	-	2	-	(-)
3	-	-	1	(-)
4	0,50	1	-	(-)
5	0,50	-	0,50	(-)
6	-	1	0,50	(-)
7	0,67	0,34	0,17	(-)
8	0,17	1,34	0,17	(-)
9	0,17	0,34	0,67	(-)
10	0,33	0,66	0,33	(-)

(-) ausência de crescimento em todas as combinações testadas

3.5 Tratamentos dos biofilmes, em superfície de polipropileno com soluções sanificantes à base de óleos essenciais

Na Tabela 8 são apresentadas as contagens de células sésseis aderidas aos cupons da superfície de polipropileno, após o tratamento com a solução sanificante controle, as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e o sanificante utilizado comercialmente, nos tempos de 10 e 20 minutos.

Tabela 8 Número de células sésseis (Log UFC/cm²) de *Cronobacter sakazakii*, quantificadas nas superfícies de polipropileno, após 48 horas de formação do biofilme, após tratamento com a solução sanificante controle e as soluções sanificantes à base de óleos essenciais

Agente sanificantes	Tempo de exposição	
	10 min	20 min
Tratamento 1	3,21±0,56 A	2,62±1,30 B
Tratamento 2	5,06±1,05 B	2,35±2,06 B
Controle 1	5,03±0,65 B	5,18±0,92 C
Controle 2	4,70±0,16 B	0,61±1,06 A

Tratamento 1 = ensaio 7 (67% de óleo de canela, 17% de óleo de howood, 17% de óleo de menta), tratamento 2= ensaio 10 (33% de óleo de canela, howood e menta), tratamento 3= Sandet 666. Resultados expressos pela média de contagem de células sésseis (Log UFC/cm²) ±desvio padrão. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si, pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade

No estudo da formação de biofilme em superfície de polipropileno e ação do sinergismo dos óleos sobre o biofilme de *C. sakazakii*, realizou-se o experimento em cupons de polipropileno. Foram testados os ensaios 7 e 10 com diferentes tempos de contato com a solução sanificante e o sanificante Sandet 666. Pode-se observar que o tratamento 1, com 10 minutos de exposição, apresentou diferença significativa, quando comparado com os tratamentos 2 e 3, havendo redução do número de células. Já para o tempo de exposição de 20 minutos, houve diferença significativa para o tratamento 3, quando comparado com os tratamentos 1 e 2. Após a exposição de 20 minutos aos tratamentos, houve significativa queda do número de células, quando comparado com o controle, significando que as soluções testadas reduziram o número de células, como observado na Tabela 8.

4 DISCUSSÃO

Segundo estudo realizado por Valeriano et al. (2012), foi demonstrado que os óleos essenciais de *Mentha piperita*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum basilicum* e *Origanum majorana* apresentaram significativa atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli* enteropatogênica, *Salmonella enteritidis* e *C.sakazaki*, sendo o óleo essencial de *Ocimum basilicum* o mais efetivo contra *C. sakazakii*.

O óleo de canela foi o que apresentou melhor resultado sobre as células planctônicas de *C. sakazakii*, o que se assemelha com o estudo realizado por Andrade et al. (2012). Avaliando a ação de óleos essenciais sobre células planctônicas de *E.coli*, estes autores observaram que o óleo essencial de canela foi o mais efetivo na inibição das células bacterianas. Ooi et al. (2006) verificaram que o óleo essencial de *C. cassia* e o cinamaldeído foram igualmente efetivos na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Salmonella typhimurium*.

Em estudo realizado por Trajano et al. (2009), o óleo de *M. piperita* foi eficaz contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* e *Serratia marcescens*, inibindo o crescimento bacteriano. Esses resultados assemelham-se ao do presente estudo, com resultado satisfatório para *C. sakazakii*. Já os resultados encontrados por Mimica-Dukić et al. (2003), que pesquisaram a atividade antimicrobiana e antioxidante de *M. piperita*, observaram que o vegetal teve uma ação moderada bacteriostática especialmente sobre *E. coli*, mas não foi observada atividade antibacteriana deste óleo contra a cepa de *E. coli*.

Vários estudiosos têm avaliado a atividade antibacteriana de *M. piperita* (COWAN, 1999; MCKAY; BLUMBERG, 2006; TASSOU;

KOUTSOUMANIS; NYCHAS, 2000). Mentol tem sido relatado como sendo o composto responsável pela atividade antimicrobiana de *M. piperita* (SIVROPOULOU; KOKKINI; LANARAS, 1995) e foi apresentado como ativo contra *Clostridium sporogenes*, *Enterobacter aeraerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Pullorum*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, inibindo estes microrganismos em concentrações de 10 µL por placa, utilizando o método de plaqueamento em ágar (ISCAN et al., 2002).

Em estudo realizado por Liu e Yang (2012) utilizando litsea cubeba-óxido de etileno LC-OE, verificou-se que as concentrações mínimas microbicidas (MMC) para *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, *L. plantarum* e *H. anomala* foram determinadas como 750, 750, 1500, e 375 µg/g, respectivamente. Estes MMCs indicaram que o LC-EO era mais eficaz contra *H. anomala*, mas menos eficaz contra *L. plantarum*.

A solubilidade em água dos constituintes dos óleos essenciais está diretamente relacionada à capacidade de penetrar na parede celular de fungos e bactérias. Contudo, a atividade antimicrobiana desses óleos deve-se à solubilidade na bicamada lipídica da membrana celular (KNOBLOCH et al., 1989; SUPPAKUL et al., 2002). Sabe-se que, na maioria das vezes, bactérias gram-negativas são menos sensíveis aos óleos essenciais que bactérias gram-positivas, pois a parede celular das gram-negativas é rica em polissacarídeos, o que inibe a penetração das substâncias antimicrobianas (BURT, 2004).

De acordo com Silva et al. (2009), além da resistência evidenciada entre os microrganismos gram-negativos, diferenças entre resultados podem ocorrer também quanto à sensibilidade de linhagens diferentes de um determinado microrganismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal, mesmo quando a metodologia utilizada é idêntica. Em seu estudo avaliando a atividade

antibacteriana de óleos essenciais provenientes de seis espécies vegetais frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, os mesmos autores encontraram uma maior resistência da bactéria gram-negativa, a qual necessitou de uma maior quantidade dos óleos essenciais testados, os quais apresentaram, para os óleos de alecrim, cravo-da-índia, gengibre, capim-cidreira e hortelã-pimenta, valores de concentração inibitória mínima de >3,0; 0,25; 0,24; 0,40 e 0,63, enquanto os valores encontrados frente à bactéria gram-positiva foram de 0,40; 0,073; 0,04; 0,1 e 0,19, respectivamente.

No teste da combinação dos três óleos essenciais foi observada inibição do crescimento, mesmo quando utilizados valores abaixo do MIC. Isso foi explicado por Burt (2004), quando o efeito combinado das substâncias é maior do que a soma dos efeitos individuais, isto é, a sinergia; antagonismo acontece quando uma combinação mostra efeito menor, em comparação com as aplicações individuais. Os efeitos sinérgicos de alguns compostos, além dos principais componentes na EOS, têm sido demonstrados em alguns estudos (ABDALLA et al., 2007; BECERRIL et al., 2007; ROTA et al., 2008).

Cronobacter sakazakii apresentou capacidade de formação de biofilme. Os microrganismos, em seu estilo de vida planctônico, recebem algum estímulo que os leva a aderir em alguma superfície. Embora esse processo necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciá-lo já são descritos, como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos e inorgânicos e temperatura (OULAHAL et al., 2008).

As células organizadas em biofilme passam a apresentar vantagens em relação às células em seu estado planctônico; por terem maiores condições de sobrevivência e menores chances de erradicação (MORCK; OLSON; CERI, 2001), podem apresentar também maior resistência a sanificantes utilizados, como apresentado neste trabalho.

Biofilmes podem ser formados por quase todos os tipos de microrganismos sob condições favoráveis. Entretanto, nas indústrias de alimentos são as bactérias que mais frequentemente produzem biofilmes, ainda que umas apresentem maior aptidão que outras. Dentre as bactérias deteriorantes, destacam-se *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterococcus faecium* (ANDRADE; BRIDGEMAN; ZOTTOLA, 1998; LERICHE; CARPENTIER, 1995). Como exemplos de bactérias patogênicas, encontram-se *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *S. aureus* e *B. cereus* (LERICHE; CARPENTIER, 1995; SMITH; FRATÂMICO, 1995; SURMAN; MORTON; KEEVIL, 1996).

Iversen, Lane e Forsythe (2004) investigaram o potencial de cepas de *C. sakazakii* em formar biofilme em materiais comumente encontrados tanto em ambiente industrial como doméstico, tais como silicone, látex, policarbonato e aço inoxidável. A formação de biofilme foi verificada em todos os materiais.

A adesão das células bacterianas depende de fatores como a fisiologia e a morfologia das células e as propriedades físico-químicas da superfície de contato. Os microrganismos gram-negativos apresentam maior facilidade de adesão em superfícies, em comparação aos gram-positivos, pois estes apresentam pili, fimbrias e flagelo, bem como a membrana externa. Para microrganismos eletricamente carregados com cargas negativas, estes apresentam maior dificuldade de ligação direta às superfícies. A participação de filme condicionante, formado por diversos compostos e moléculas provenientes da fase aquosa, será determinante.

Oliveira, Brugnetra e Piccoli (2010) demonstraram eficiência de soluções sanificantes formuladas à base de óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e capim-citronela (*Cymbopogon nardus*) e sua combinação, na eliminação de biofilme de *Listeria monocytogenes* formado em

superfície de aço inoxidável. Neste estudo, todas as soluções sanificantes foram efetivas na redução do número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície, mas a solução formulada a partir da combinação dos dois óleos essenciais apresentou a melhor eficácia, possibilitando a não recuperação de células viáveis, após 60 minutos de contato.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e sua combinação apresentaram CMI de 0,10% sobre *Staphylococcus aureus*. Todas as soluções sanificantes à base de óleos essenciais se mostram efetivas na redução de biofilme bacteriano formado por *S. aureus* em superfície e aço inoxidável e polipropileno, sendo a combinação mais efetiva (SANTOS JÚNIOR et al., 2014).

Em pesquisa realizada por Esper (2010) ficou evidenciada a capacidade de *E. sakazakii* e *B. cereus* de formar biofilmes em superfície de aço inoxidável, utilizando cultivos em fórmula infantil e caldo Luria Bertani, sendo mais intensa em fórmula infantil. Foi realizado cultivo monoespécie e cultivo misto, e foi verificado que o nível de contagem de *E. sakazakii* foi superior ao de *B. cereus*.

Para o tratamento controle 2, após 20 minutos de contato, houve significativa redução do número de células. Este fato pode ser explicado pelo fato de os compostos quaternário de amônio, entre os quais se encontra o cloreto de benzalcônio, serem detergentes catiônicos sintéticos que têm atividade antimicrobiana, boa estabilidade, solubilidade em água e toxicidade relativamente baixa (PELCZAR et al., 1980). A ação bactericida é atribuída à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, à desnaturação de proteínas celulares e à ruptura da membrana celular (ROMÃO, 1996).

5 CONCLUSÃO

Dentre os óleos essenciais testados nas células planctônicas, o de canela obteve melhor resultado, com CMB 0,125%. No estudo do sinergismo houve ausência do crescimento em todas as combinações testadas. Houve aumento da CMB para as células sésseis; canela e menta apresentaram 1% e ho wood, 2%. Também não foi observado crescimento bacteriano no estudo do sinergismo dos óleos sobre células sésseis. Para o teste realizado no cupom de polipropileno, a solução sanificante composta pelo ensaio 7 foi melhor para o tempo de 10 minutos de contato e, para 20 minutos de contato, o sanitizante Sandett 666 a foi mais efetivo.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. E. M. et al. Egyptian mango by-product 2: antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 1141-1152, 2007.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocida activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 833-838, July 1998.
- BECERRIL, R. et al. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 388, n. 5/6, p. 1003-1011, 2007.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CHORIANOPOULOS, N. G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bacteria effect of essential oil and hydrosol of *Stureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, Dec. 2008.
- COWAN, M. M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

ESPER, L. M. R. **Enterobacter sakazakii** (*Cronobacter spp.*) e **Bacillus cereus**: quórum sensing, formação de biofilme e ação de sanitizantes. 2010. 103 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FARBER, J. M. *E. sakazakii*: new foods for thought? **Lancet**, London, v. 363, n. 9402, p. 5-6, Jan. 2004.

ISCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, 2002.

IVERSEN, C.; FORSYTHE, S. J. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 771-777, Dec. 2004.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 378-382, 2004.

KANDHAI, M. C. et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. **Lancet**, London, v. 363, n. 9402, p. 39-40, Jan. 2004.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 1, n. 1, p. 119-128, 1989.

LAI, K. K.; DMD, M. D. *Enterobacter sakazakii* Infection among neonates, infants, children and adults: case reports and review of the literature. **Medicine**, London, v. 80, n. 2, p. 113-122, Mar. 2001.

LECLERCQ, A.; WANEGUE, C.; BAYLAC, P. Comparasion of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 6, p. 1631-1638, 2002.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but non culturable *Salmonella typhimurium* in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 11, p. 1186-1191, 1995.

LIU, T.; YANG, T. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 68-75, 2012.

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

MIMICA-DUKIĆ, N. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three mentha species essential oils. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 5, p. 413-419, 2003.

MORCK, D. W.; OLSON, M. E.; CERI, H. Microbial Biofilms: preservation, control and removal. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. Lippincott: Williams & Wilkins, 2001. p. 675-681.

MUYTJENS, H. L.; KOLLÉE, L. A. *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates: causative role of formula? **Pediatric Infectious Disease**, Baltimore, v. 9, p. 372-373, 1990.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. 8th ed. Wayne, 2003. 60 p. (NCCLS Document M2-A8).

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETRA, D. F.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of Cymbopogon sp. essential oil in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

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

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

PELCZAR, M. et al. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. v. 1, 1072 p.

ROMÃO, C. M. C. A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Org.). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996. p. 133-162.

ROTA, M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 7, p. 681-687, July 2008.

SAKAZAKI, R. *Enterobacter cloacae*. In: BERGEY, D. H.; BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1974. p. 325.

SANTOS JÚNIOR, A. C. et al. Ação de sanitizantes sobre *Staphylococcus aureus* biofilme em superfícies de aço inoxidável e polipropileno. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 8, n. 36, p. 3347-3353, Sept. 2014.

SILVA, M. T. N. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 3, p. 257-262, 2009.

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

SMITH, J. L.; FRATÂMICO, P. M. Factors involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 6, p. 696-708, 1995.

SUPPAKUL, P. et al. Preliminary study of antimicrobial films containing principal constituents of basil. In: IAPRI WORLD CONFERENCE ON PACKAGING, 13., 2002, East Lansing. **Proceedings...** East Lansing: CRC, 2002. 1 CD-ROM.

SURMAN, S. B.; MORTON, L. H. G.; KEEVIL, C. W. Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest**, Melbourne, v. 13, n. 1, p. 33-38, 1996.

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

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

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

WALKER, J. T. et al. Microbial biofilm formation and contamination of dental: unit water systems in general dental practice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3363-3367, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO workshop on *Enterobacter sakazakii*, and other microorganism in powdered infant formula**. Geneva, 2004. 59 p.