FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL, BIOTRANSFERÊNCIA E SENSIBILIDADE DE *Listeria monocytogenes* A ÓLEOS ESSENCIAIS

MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA

FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL, BIOTRANSFERÊNCIA E SENSIBILIDADE DE *Listeria monocytogenes* A ÓLEOS ESSENCIAIS

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

Orientadora
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

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

Oliveira, Maíra Maciel Mattos de.
Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes* a óleos essenciais / Maíra Maciel Mattos de Oliveira. – Lavras: UFLA, 2009.
154 p.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli.
Bibliografia.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Biofilme. 3. *Cymbopogon* sp. 4. Óleos essenciais. 5. Sanificantes naturais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

MAÍRA MACIEL MATTOS DE OLIVEIRA

FORMAÇÃO DE BIOFILME EM AÇO INOXIDÁVEL, BIOTRANSFERÊNCIA E SENSIBILIDADE DE *Listeria monocytogenes* A ÓLEOS ESSENCIAIS

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

APROVADA em 5 de fevereiro de 2009.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Dedico este trabalho a minha mãe, Beth e ao meu namorado, Danilo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida e pelo grande aprendizado proporcionado por mais esta experência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora, Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência, por estar sempre disposta a ajudar e, principalmente, por todo carinho e pela amizade verdadeira.

A minha co-orientadora, Profa. Maria das Graças Cardoso, pela disponibilidade, atenção, ensinamentos e sugestões.

Ao Prof. Eduardo Alves, pela atenção, sugestões e, principalmente, pela disponibilidade e colaboração na realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ao Danilo, por ser, ao mesmo tempo, namorado, amigo e estagiário. Sua ajuda e conselhos foram fundamentais na realização deste trabalho. Seu amor, alegria e paciência, mesmo nos momentos mais difíceis, tornam a minha vida muito mais feliz.

A minha mãe, Beth, por ter sempre acreditado em mim, por estar sempre por perto quando eu preciso, pela paciência durante os momentos difíceis e por todas as conversas e conselhos. Sua presença e amor são muito importantes em minha vida.

Aos meus famíliares que, mesmo distante, sempre torceram pelo meu sucesso: meu tio Ulysses, minha vó Maria Luíza, minha tia Analice e meu pai, Hercélio.

A minha segunda família, Florisvaldo, Isabel e Michelle, pelas ajudas, carinho, por sempre torcerem por mim e pelos ótimos momentos de convivência.

Ao Prof. Marcelo Ângelo Cirillo, do Departamento de Ciências Exatas (DEX) da UFLA, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Ao Luíz Gustavo de Lima Guimarães, pelo valioso auxílio na realização e interpretação das análises cromatográficas.

Aos alunos do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química (DQI) da UFLA, Felipe, Gisele, Luíz Gustavo, Milene, Paula, Rafaela, Roberta, Sara e Vanessa, pela ajuda na extração dos óleos essenciais.

Às técnicas de laboratório do DCA, Creusa, Eliane, Sandra e Tina, pelas ajudas e pelo agradável convívio.

À Eloísa, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da UFLA, pela ajuda na realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pela boa vontade em ensinar.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA (UFLA), Alessandra, Carolina, Cleube, Danila, Dieyckson, Eliza, Luzia, Nélio, Simone, Suzana, Thales e Victor, pelas trocas de experiências e pelos momentos agradáveis.

A todos os amigos da Pós-Graduação, por todos os conselhos e momentos de estudo e também de descontração.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS..... i
LISTA DE FIGURAS..... iii
RESUMO GERAL..... vii
GENERAL ABSTRACT..... ix
CAPÍTULO 1..... 1
1 Introdução geral..... 2
2 Referencial teórico..... 6
2.1 Biofilmes microbianos: conceito, estrutura e composição..... 6
2.2 Etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos..... 8
2.3 Mecanismos de resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos.... 14
2.4 Impactos causados pela presença de biofilmes microbianos na indústria de alimentos..... 15
2.5 Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes..... 16
2.5.1 *Listeria monocytogenes*..... 17
2.5.1.1 Listeriose..... 19
2.5.1.2 Ocorrência em alimentos e superfícies de indústrias alimentícias. 23
2.6 Controle e remoção de biofilmes microbianos na indústria de alimentos..... 25
2.6.1 Higienização..... 25
2.6.2 Novas alternativas..... 27
2.6.2.1 Óleos essenciais..... 27
2.7 *Cymbopogon* sp…… 36

2.7.1 *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf..... 36
2.7.2 *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle..... 39
3 Referências Bibliográficas..... 41
CAPÍTULO 2: Atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*..... 60
1 Resumo..... 61
2 Abstract..... 62
3 Introdução..... 63
4 Material e métodos..... 66
4.1 Locais de execução do experimento..... 66
4.2 Material vegetal..... 66
4.2.1 Determinação da umidade..... 67
4.2.2 Óleos essenciais..... 67
4.2.2.1 Extração e determinação do rendimento..... 67
4.2.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes químicos..... 68
4.3 Determinação da atividade antibacteriana..... 69
4.3.1 Microrganismo utilizado, padronização, estocagem e preparo do inóculo..... 69
4.3.2 Efeito bacteriostático..... 70
4.3.3 Tempo de ação bactericida..... 71
4.4 Delineamento experimental e análise estatística..... 72
5 Resultados e discussão..... 73
6 Conclusões..... 82
7 Referências bibliográficas..... 83
CAPÍTULO 3: Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável e potencial de biotransferência..... 88
1 Resumo..... 89
2 Abstract..... 90

3 Introdução..... 91
4 Material e métodos..... 94
4.1 Locais de execução do experimento..... 94
4.2 Microrganismo utilizado, padronização, estocagem e preparo do inóculo..... 94
4.3 Modelo experimental de formação do biofilme..... 95
4.4 Preparo dos cupons e suporte de aço inoxidável..... 96
4.5 Adesão das células bacterianas a superfície dos cupons de aço inoxidável..... 97
4.6 Enumeração das células bacterianas aderidas..... 97
4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 98
4.8 Avaliação do potencial de biotransferência..... 99
4.9 Determinação da capacidade de adesão inicial..... 99
5 Resultados e discução..... 100
6 Referências biliográficas..... 111
CAPÍTULO 4: Ação sanificante de óleos essenciais de *Cymbopogon* sp. em diferentes etapas da formação do biofilme por *Listeria monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável..... 116
1 Resumo..... 117
2 Abstract..... 118
3 Introdução..... 119
4 Material e métodos..... 122
4.1 Locais de execução do experimento..... 122
4.2 Microrganismo utilizado, padronização, estocagem e preparo do inóculo..... 122
4.3 Modelo experimental de formação do biofilme..... 123
4.4 Preparo dos cupons e suporte de aço inoxidável..... 123
4.5 Adesão das células bacterianas à superfície dos cupons de aço

inoxidável..... 124
4.6 Óleos essenciais..... 124
4.6.1 Extração, identificação e quantificação dos constituintes químicos. 124
4.6.2 Tratamentos dos cupons de aço inoxidável com as soluções sanificantes..... 126
4.7 Enumeração das células bacterianas aderidas..... 128
4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)..... 128
4.9 Delineamento experimental e análise estatística..... 129
5 Resultados e discussão..... 130
6 Conclusões..... 142
7 Referências bibliográficas..... 143
ANEXOS..... 149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

		Página
TABELA 1	Composição das soluções à base de óleos essenciais e solução controle utilizadas na determinação do tempo de ação bactericida.....	71
TABELA 2	Percentagem de umidade das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* e rendimento de seus óleos essenciais em base livre de umidade (BLU).....	73
TABELA 3	Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* identificados por CG/(EM) e seus teores.....	74
TABELA 4	Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* identificados por CG/(EM) e seus teores.....	75
TABELA 5	Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus* e sua combinação, frente a *Listeria monocytogenes*.....	78

CAPÍTULO 3

		Página
TABELA 1	Número de células planctônicas (Log UFC.mL^{-1}) e sésseis (Log UFC.cm^{-2}) de *Listeria*	

monocytogenes, quantificadas durante a formação do biofilme sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), com incubação a 37 °C e utilizando meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato..... 101

CAPÍTULO 4

Página

TABELA 1 Composição das soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle..... 127

TABELA 2 Número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC.cm^{-2}, às 3 horas de formação do biofilme, após tratamento com as soluções sanificantes a base de óleos essenciais e solução sanificante controle..... 131

TABELA 3 Número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC.cm^{-2}, às 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com as soluções sanificantes a base de óleos essenciais e solução sanificante controle..... 131

TABELA 4 Redução no número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), às 3 e 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle..... 140

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

		Página
FIGURA 1	Principais etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos. Adaptado de Xavier et al. (2003).....	14
FIGURA 2	Eletromicrografias de transmissão e desenho dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. Adaptado de Tilney & Portnoy (1989) e Portnoy et al. (2002).....	22
FIGURA 3	Biossíntese de fenilpropanoides (Santos, 2004).....	29
FIGURA 4	Biossíntese de terpenos (Santos, 2004).....	30
FIGURA 5	Biossíntese dos terpenos pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). Adaptado de Wanke et al. (2001).....	32
FIGURA 6	Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana. Adaptado de Burt (2004).....	34
FIGURA 7	Aspecto geral da espécie *Cymbopogon citratus*.....	37
FIGURA 8	Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).....	38
FIGURA 9	Aspecto geral da espécie *Cymbopogon nardus*.....	39
FIGURA 10	Estruturas químicas do citronelal (A) e do geraniol (B).....	40

CAPÍTULO 2

		Página
FIGURA 1	Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*.....	76

CAPÍTULO 3

		Página
FIGURA 1	(A) Modelo experimental de formação do biofilme, utilizando como substrato de crescimento bacteriano meio de cultura caldo triptona de soja (TSB). (B) Suporte e cupons de aço inoxidável AISI 304 (#4) pertencentes ao modelo experimental de formação do biofilme.....	96
FIGURA 2	Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 3 horas de contato a 37 °C, utilizando-se meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato. (A) Células aderidas à superfície, em sua maioria, em processo de fissão binária. (B) Visão de maior área do cupom, mostrando a pouca adesão das células.....	102
FIGURA 3	Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 144 horas de contato a 37 °C, utilizando-se meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato. (A)	

Menor densidade celular. (B) Maior densidade celular..... 105

FIGURA 4 Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 240 horas de contato a 37 °C, utilizando-se meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato. (A) Biofilme maduro. (B) Células aderidas uniformemente..... 108

CAPÍTULO 4

Página

FIGURA 1 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 3 horas de contato a 37 °C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas às soluções sanificantes à base de óleos essenciais, puros e em combinação. (A) *C. citratus*, 15 minutos de tempo de contato; (B) *C. citratus*, 60 minutos de tempo de contato; (C) *C. nardus*, 15 minutos de tempo de contato; (D) *C. nardus*, 60 minutos de tempo de contato; (E) combinação, 15 minutos de tempo de contato; (F) combinação, 60 minutos de tempo de contato..... 134

FIGURA 2 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 240 horas de

contato a 37 °C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas às soluções sanificantes à base de óleos essenciais, puros e em combinação. (A) *C. citratus*, 15 minutos de tempo de contato; (B) *C. citratus*, 60 minutos de tempo de contato; (C) *C. nardus*, 15 minutos de tempo de contato; (D) *C. nardus*, 60 minutos de tempo de contato; (E) combinação, 15 minutos de tempo de contato; (F) combinação, 60 minutos de tempo de contato..... 135

FIGURA 3 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 3 horas de contato a 37 °C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas à solução sanificante controle (sem óleo essencial). (A) 15 minutos de tempo de contato e (B) 60 minutos de tempo de contato..... 137

FIGURA 4 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 240 horas de contato a 37 °C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas à solução sanificante controle (sem óleo essencial). (A) 15 minutos de tempo de contato e (B) 60 minutos de tempo de contato..... 137

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes* a óleos essenciais**. 2009. 154 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

A formação de biofilmes em superfícies industriais pode levar à contaminação de alimentos. Dentre os microrganismos envolvidos, destaca-se *Listeria monocytogenes*, devido à sua distribuição ubíqua, capacidade de sobrevivência em condições adversas e elevada patogenicidade. Logo, o desenvolvimento de novas alternativas de controle é fundamental. Este trabalho foi realizado no intuito principal de estudar a formação do biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19117 sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) e avaliar a sensibilidade de células planctônicas e sésseis frente à ação antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação utilizando-se aparelho de Clevenger modificado. O efeito bacteriostático de diferentes concentrações dos óleos essenciais, puros e em combinação, foi avaliado pela técnica de difusão em ágar. As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) encontradas foram utilizadas na determinação do tempo de ação bactericida. A formação do biofilme foi realizada sobre superfície de cupons de aço inoxidável, utilizando-se como substrato caldo triptona de soja, com incubação a 37°C e agitação de 50 rpm. O número de células aderidas foi determinado após 3, 48, 96, 144, 192 e 240 horas e o potencial de biotransferência a partir das 96 horas. Cupons de aço inoxidável foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 3, 144 e 240 horas. Soluções sanificantes à base de óleos essenciais e uma solução sanificante controle foram testadas em duas etapas de formação do biofilme (3 e 240 horas) em dois tempos de contato (15 e 60 minutos). As quantidades de óleos essenciais utilizadas nas soluções sanificantes foram baseadas nas CMIs e os tempos de contato foram determinados a partir dos tempos de ação bactericida. Cupons de aço inoxidável submetidos às soluções sanificantes foram analisados por MEV e tiveram o número de células aderidas determinado. As CMIs encontradas foram de 1,56% (v/v), para o óleo essencial de *C. citratus* e para a combinação dos óleos essenciais e de 3,56% (v/v) para o óleo essencial de *C. nardus*. Observou-se efeito bactericida para os óleos essenciais, puros e em combinação, quando estes foram utilizados na concentração mínima inibitória (CMI). Pelo número de

*Comitê Orientador: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Orientadora) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-orientadora)

células aderidas e MEV observou-se que *L. monocytogenes* aderiu rapidamente à superfície, formando biofilme maduro após 240 horas. O potencial de biotransferência da bactéria ao substrato foi observado em todas as etapas analisadas. As soluções sanificantes à base de óleo essencial mostraram-se efetivas na redução do número de células aderidas, principalmente após 60 minutos de contato. A solução sanficante constituída da combinação dos óleos essenciais foi capaz de reduzir 100% (5,64 Log UFC.cm^{-2}) do número de células aderidas após 60 minutos de contato às 240 horas de formação do biofilme. Pela MEV observaram-se alterações estruturais na superfície bacteriana, provavelmente causadas pela atuação dos óleos essenciais na membrana citoplasmática. Apesar de *L. monocytogenes* apresentar risco para as indústrias de alimentos, devido à capacidade de rápida adesão e ao potencial de biotransferência, óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* apresentam atividade antibacteriana frente a células planctônicas e sésseis e são novas alternativas naturais a sanificação de superfícies de aço inoxidável. O efeito sinergístico da combinação dos mesmos não deve ser descartado e representa uma maneira de potencializar a atividade individual desses compostos.

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. **Biofilm formation on stainless steel, biotransfer and sensitivity of *Listeria monocytogenes* to essential oils**. 2009. 154 p. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Biofilm formation on industrial surfaces can lead to food contamination. Among the microorganisms involved, *Listeria monocytogenes* stands out, due to its ubiquitous distribution, survival capacity under adverse conditions and high pathogenicity. Therefore, the development of new control alternatives is fundamental. This work was carried out with the main intention of studying biofilm formation by *L. monocytogenes* ATCC 19117 on the surface of stainless steel AISI 304 (#4) and to evaluate the sensitivity of planktonic and sessil cells in relation to the antibacterial action of *Cymbopogon citratus* (A.D.) Stapf. and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle essential oils. The extraction of the essential oils was accomplished by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus. The bacteriostatic effect of different concentrations of the essential oils, pure and in combination was evaluated by the agar diffusion technique. The minimum inhibitory concentrations (MICs) found were used in the determination of the time of bactericidal action. The formation of the biofilm was done on the surface of stainless steel coupons, triptic soy broth being used as substrate, with incubation at 37 °C and agitation of 50 rpm. The number of adhered cells was determined after 3, 48, 96, 144, 192 and 240 hours and the biotransfer potential starting from 96 hours. Stainless steel coupons were submitted to scanning electron microscopy (SEM) after 3, 144 and 240 hours. Disinfectant solutions based on essential oils and a control disinfectant solution were tested at two stages of the biofilm formation (3 and 240 hours) at two contact durations (15 and 60 minutes). The amounts of essential oils used in the disinfectant solutions were based on MICs and the contact times were determined starting from the times of bactericidal action. Stainless steel coupons submitted to the disinfectant solutions were analyzed by SEM and the number of adhered cells was determined. MICs found were 1.56% (v/v) for the essential oil of C. *citratus* and for the combination of the essential oils and, 3.56% (v/v) for *C. nardus* essential oil. Bactericidal effect was observed for the essential oils, pure and in combination, when these were used at the minimum inibitory concentration (MIC). According to the number of adhered cells and SEM, it was observed that *L. monocytogenes* adhered quickly to the surface, forming ripe

*Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Adviser) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-adviser)

biofilm after 240 hours. The biotransfer potential of the bacterium to the substrate was observed in all of the analyzed stages. The essential oil based disinfectant solutions was shown effective in the reduction of the number of adhered cells, mainly after 60 minutes of contact. The disinfectant solution constituted by the combination of essential oils was capable of reducing 100% (5.64 Log UFC.cm^{-2}) of the number of cells adhered after 60 minutes of contact at 240 hours of formation of the biofilm. As for SEM, structural alterations were observed in the bacterial surface, probably caused by the performance of the essential oils on the cytoplasmatic membrane. In spite of *L. monocytogenes* presenting a risk to the food industry, due to its fast adhesion capacity and biotransfer potential, essential oils of *C. citratus* and *C. nardus* present antibacterial activity facing planktonic and sessil cells and they are new natural alternatives for the disinfection of stainless steel surfaces. The synergistic effect of the combination of these oils should not be discarded and represents a way to enhance the individual activity of these compounds.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana séssil, caracterizada pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos em ambientes com condições adversas (Costerton et al., 1999).

A presença de biofilmes em áreas de processamento de alimentos é caracterizada, inicialmente, pelo acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos em superfícies, sobre as quais comunidades bacterianas podem se desenvolver. Biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, partes dele podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios (Joseph et al., 2001). Entretanto, sabe-se que a habilidade de transferência de bactérias sésseis ao alimento é independente do número de células microbianas presentes na superfície. O termo potencial de biotransferência ilustra essa habilidade e enfatiza a capacidade de contaminação do alimento a partir de células aderidas à superfície durante os vários estágios de desenvolvimento do biofilme (Hood & Zottola, 1995; Midelet & Carpentier, 2004).

Diversas superfícies utilizadas no processamento de alimentos são passíveis de apresentar adesão ou formação de biofilme de origem bacteriana. O aço inoxidável é amplamente utilizado em equipamentos e utensílios na indústria de alimentos devido à superfície lisa e pouco porosa, elevada vida útil e alta resistência à corrosão. Porém, frequentemente, superfícies de aço inoxidável são

reconhecidas como importantes fontes de contaminação microbiana (Chmielewski & Frank, 2003).

Inúmeros microrganismos são capazes de participar do processo de adesão e formação de biofilmes. Na indústria de alimentos estes podem ser divididos em deteriorantes e patogênicos. No que diz respeito aos microrganismos patogênicos, *Listeria monocytogenes* pode ser destacada devido a sua sobrevivência a temperaturas de refrigeração, baixos valores de pH, relativa resistência ao calor e elevadas concentrações de sais. Estas propriedades tornam esta bactéria especialmente difícil de ser controlada em ambientes de processamento de alimentos, sendo, por esse motivo, comumente isolada, principalmente em indústrias processadoras de carne e produtos cárneos (Senczek et al., 2000; Cruz et al., 2008), leite e derivados lácteos (Chambel et al., 2007).

A listeriose, causada pela ingestão de células viáveis de *L. monocytogenes*, é uma infecção de origem alimentar mundialmente conhecida pelo longo período de incubação e elevada taxa de mortalidade. A doença acomete principalmente indivíduos imunodeprimidos, recém-nascidos, idosos e gestantes. Entretanto, também é capaz de afetar indivíduos saudáveis, dependendo do número de células ingeridas e da virulência da cepa em questão. Sua manifestação ocorre como gastrenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante ao feto e septicemias. Células sésseis são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver mesmo após processos de sanificação, representando fonte original de contaminação de alimentos e consequentes toxinfecções alimentares em humanos e animais (Chavant et al., 2007).

Estratégias de controle de biofilmes devem retardar a sua formação e reduzir, ou mesmo eliminar, o seu acúmulo nos equipamentos. A seleção do sanificante mais efetivo deve ser suportada por estudos laboratoriais prévios no

sentido de determinar a concentração mais adequada, bem como o tempo de contato e a frequência de aplicação mais corretos. Os inconvenientes ambientais associados ao uso de sanificantes químicos não podem ser descartados e devem ser considerados na escolha do produto.

Atualmente, elevado número de estudos objetivando encontrar estratégias efetivas de eliminação de biofilmes têm sido publicados, enfatizando a necessidade de obtenção de novos produtos com ação sanificante. Entre as novas ferramentas recentemente pesquisadas, com potencial aplicabilidade nas indústrias de produtos alimentícios, encontra-se a utilização de óleos essenciais ou de seus constituintes individualmente (Knowles et al., 2005; Chorianopoulos et al., 2008).

Óleos essenciais são produtos voláteis do metabolismo secundário de plantas aromáticas, formados em células especiais e encontrados em folhas, flores, sementes, caules e raízes. De forma geral, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (Simões & Spitezer, 2004), capazes de agir na superfície celular bacteriana causando, principalmente, comprometimento estrutural e funcional da membrana citoplasmática (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

A possível utilização de óleos essenciais como agentes sanificantes é assegurada pelo aumento na procura de produtos considerados como naturais. Neste contexto, destaca-se a elevada biodiversidade do Brasil em plantas medicinais e aromáticas já empregadas em indústrias cosméticas, de perfumaria e farmacêuticas. O gênero *Cymbopogon* pertence à família das Poaceae, mais comumente conhecidas como gramíneas, e é encontrado em grande parte do território brasileiro. Dentro deste gênero, em termos de produção de óleos essenciais, destacam-se *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (capim-limão) e *Cymbopogon nardus* L. Rendle (capim-citronela).

Diante do exposto, o presente trabalho baseou-se no alcance dos seguintes objetivos:

a) determinar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*;

b) avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, puros e em combinação, frente a *L. monocytogenes*;

c) propor a utilização de um modelo experimental e, por este, estudar a formação do biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) utilizando contagem padrão em placas e microscopia eletrônica de varredura (MEV);

d) avaliar o potencial de biotransferência durante o processo de formação do biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4);

e) avaliar a ação sanificante dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, puros e em combinação, em duas etapas distintas da formação do biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), utilizando contagem padrão em placas e MEV. A MEV foi realizada, nesta etapa do trabalho, com o intuito de observar a ocorrência de alterações estruturais na superfície bacteriana, devido à ação antibacteriana dos óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biofilmes microbianos: conceito, estrutura e composição

Biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares (Nikolaev & Plakunov, 2007) e aderidas a superfícies bióticas ou abióticas (Dunne Junior, 2002; Lasa et al., 2005).

A formação de biofilmes produz um ambiente dinâmico, no qual células microbianas se encontram em estado de homeostase, organizadas de maneira a utilizar todos os nutrientes disponíveis (Sutherland, 2001). De acordo com Costerton et al. (1987), biofilmes constituem consórcios funcionais de microrganismos aderidos a superfícies e envoltos por matrizes de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana. Ainda, na concepção de Hood & Zotolla (1995), biofilmes não incluem somente bactérias, mas também todo material extracelular produzido, bem como qualquer material aprisionado dentro da matriz resultante.

Em ambientes naturais, de 95% a 99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuam nível de umidade suficiente para suportar seu crescimento (Kim & Frank, 1995; Nikolaev & Plakunov, 2007). Atualmente, a forma de vida bacteriana livre ou planctônica é observada, simplesmente, como mecanismo de translocação entre superfícies (Watnick & Kolter, 2000). Em seu ambiente natural, a maioria das espécies alterna entre o estado planctônico e o estado séssil em resposta a estímulos ambientais, tais como a disponibilidade de nutrientes essenciais (Lynch & Robertson, 2008).

Biofilmes microbianos podem existir como agregados mais ou menos confluentes, em camadas únicas ou arquiteturas tridimensionais (Stoodley et al., 2002). Quando constituídos por várias camadas de células, apresentam canais que permitem fluxo de líquido e gases, dispersão de nutrientes e descarte de componentes (Stoodley et al., 2002; McLandsborough et al., 2006).

A composição dos biofilmes é dependente das condições do meio, como temperatura, substâncias envolvidas, pressão, pH e oxigênio dissolvido, não sendo necessariamente uniforme, podendo abranger partículas sólidas inorgânicas, como argilas e areias, bem como partículas orgânicas provenientes do substrato aquoso onde está imerso (Wimpenney et al., 1993; Toole et al., 2000).

O biofilme apresenta-se como estrutura adsorvente e porosa, na qual a água é a fração mais significativa, podendo variar entre 70% a 95%, ou mais, da massa total (Characklis, 1981; Flemming, 1993). Há relatos de que a razão massa de água/massa de biofilme pode chegar próximo a 99% ou, mesmo, atingir valores superiores (Azeredo & Oliveira, 2000).

Os microrganismos, por sua vez, representam somente pequena parte da massa e do volume do biofilme (frequentemente, menos de 10%), embora excretem substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca (Pereira, 2001). Segundo Flemming (1993), substâncias poliméricas extracelulares representam de 70% a 95% da matéria orgânica da massa seca do biofilme. Já Bakke et al. (1984) afirmam que a fração de substâncias poliméricas extracelulares pode variar entre 50% e 90% do total da matéria orgânica dos biofilmes.

Ao constituírem matriz de aspecto gelatinoso, os polímeros extracelulares sintetizados pelos microrganismos são denominados glicocálix (Costerton et al., 1978). Entretanto, estes polímeros extracelulares podem envolver firmemente cada uma das células como discreta camada de cobertura,

denominada cápsula, ou formarem filamentos que se estendem das células à medida que vão sendo produzidos, constituindo um emaranhado agregador de células constituintes do biofilme (Pereira, 2001). De maneira geral, a matriz de substâncias poliméricas extracelulares expõe-se exteriormente à membrana externa das bactérias gram-negativas e ao peptideoglicano das gram-positivas, sendo sintetizada por polimerases, constituindo estrutura complexa e hidratada (Carpentier & Cerf, 1993; Costerton & Lewandowski, 1995).

A matriz de substâncias poliméricas extracelulares é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa (Pereira, 2001) determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas (Flemming & Wingender, 1999). Ainda que haja a predominância de polissacarídeos (Horan & Eccles, 1986; Wimpenney et al., 1993), esta também pode ser constituída por proteínas, como glicoproteínas (Gehrke et al., 1998), ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucleico, ácido ribonucleico) (Jahn & Nielsen, 1995) e fosfolipídios (Gehrke et al., 1998).

2.2 Etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos

Biofilmes podem ser formados na interface de fronteiras estabelecidas em diferentes situações. Existem quatro interfaces nas quais associações microbianas são capazes de se desenvolver: líquido-superfície sólida, líquido-ar, entre dois líquidos imiscíveis e superfície sólida-ar. Dessa forma, quatro tipos diferentes de biofilmes podem ser encontrados. Entretanto, somente biofilmes desenvolvidos na interface de fronteiras estabelecidas entre meio aquosos e superfícies sólidas têm sido investigados em detalhes (Nikolaev & Plakunov, 2007).

A formação de biofilmes inicia-se com a adsorção de moléculas orgânicas ou inorgânicas à superfície, formando o filme condicionante. Em instalações de

indústrias alimentícias, resíduos proteicos ou lipídicos de produtos derivados do leite ou de carnes são elementos importantes para formar a camada condicionante (Kumar & Anand, 1998; Watnick & Kolter, 2000).

A fixação de células livres provenientes do meio líquido a superfícies sólidas compreende a etapa inicial de desenvolvimento do biofilme e ocorre poucos minutos após o transporte e a adsorção de substâncias orgânicas dissolvidas no meio aquoso (Machado, 2005). Mecanismos pelos quais bactérias são transportadas a superfícies incluem movimento browniano, sedimentação devido a diferenças de gravidade específica entre bactérias e o líquido circundante e transporte de massa, pelo qual as células são fisicamente transportadas pelo movimento do fluxo local (Palmer et al., 2007).

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

A primeira etapa envolvida na formação do biofilme, também conhecida como adesão dos colonizadores primários, é fundamentalmente controlada por interações iônicas negativas e ou positivas entre a parede celular dos microrganismos e as macromoléculas do filme condicionador, formado a partir de resíduos do próprio ambiente (Christensen & Characklis, 1990). A velocidade em que ocorre a formação inicial do biofilme depende da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso em contato com a superfície sólida, da afinidade das moléculas com o suporte e das condições hidrodinâmicas do meio líquido. É de fundamental importância para a adesão das moléculas orgânicas as características da superfície suporte, como carga, energia livre e rugosidade (Marshall & Blainey, 1990; Chamberlain, 1992).

Propriedades da superfície da célula, como presença de flagelo, fímbrias, píli, proteínas adesinas, lipopolissacarídeos, ácido lipoteicoico e cápsula, influenciam na aderência à superfície (Prakash et al., 2003; Trachoo, 2003), que ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (Mittelman, 1998). Dessa forma, apêndices celulares externos, como flagelos, fímbrias e pílis, desempenham papel importante na adesão celular inicial, além de formarem pontes entre células e superfície (Christensen & Characklis, 1990).

A adesão reversível se dá pela interação inicial fraca da bactéria com o substrato. Isso envolve forças de atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e forças de interações hidrofóbicas. Durante a adesão reversível, bactérias ainda exibem movimentos brownianos e são facilmente removidas pela aplicação de forças mínimas (Watnick & Kolter, 2000; Chmielewski & Frank, 2003).

Após contato com a superfície e a instalação microbiana, fases de crescimento e divisão celular ocorrem (Christensen & Characklis, 1990). A adesão irreversível resulta do ancoramento de apêndices (píli, flagelo, proteínas adesina) e ou da produção de substâncias poliméricas extracelulares (Sutherland, 1997), fazendo com que as ligações entre as células e a superfície se fortaleçam (Christensen & Characklis, 1990). A união entre apêndices da bactéria e substrato envolve interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e iônicas. Esta união geralmente ocorre com poucas horas de contato. Vários estudos indicam que a adesão irreversível das células pode começar após 20 minutos de contato, variando, no máximo, até 4 horas, de 4º a 20ºC (Hood & Zottola, 1995; Smoot & Pierson, 1998). A remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanificantes ou calor (Sinde & Carballo, 2000).

Após multiplicação das bactérias presentes na estrutura do biofilme, formando microcolônias envoltas pela matriz de polímeros extracelulares (Malone & Caldwell, 1983), pode ocorrer, dentro de dias a meses, a adesão de outros microrganismos presentes no meio aquoso circundante, denominados colonizadores secundários (Christensen & Characklis, 1990). Em adição a interações célula-substrato, interações célula-célula podem também ocorrer. Estas são denominadas coagregação, quando as células envolvidas seencontram em suspensão ou coadesão, quando a interação ocorre entre células sésseis e planctônicas. A coadesão é mais relevante em termos de acumulação de células na superfície pela colonização secundária (Busscher & Mei, 2000).

A formação do biofilme maduro ocorre de 3 a 6 dias após a adesão inicial, podendo chegar a 10 dias (Heydorn et al., 2000). A maturidade acontece, principalmente, por meio do aumento da densidade populacional e também pela pronunciada produção e deposição de polímeros extracelulares, aumentando a espessura do biofilme (Cheng et al., 2007).

O potencial de crescimento do biofilme é limitado por inúmeros fatores, tais como a disponibilidade e o transporte de nutrientes para dentro da matriz de polímeros extracelulares e a remoção de produtos de excreção. Em adição, existe o fluxo hidrodinâmico ótimo através do biofilme, que favorece o crescimento e evita a erosão das camadas mais externas (Carpentier & Cerf, 1993). Outros fatores que controlam a maturação do biofilme incluem o pH interno, a difusão de oxigênio e a osmolaridade (Carpentier & Cerf, 1993; Toole & Kolter, 1998).

Com o aumento da população microbiana, o ambiente torna-se anaeróbio no interior do biofilme, provocando aumento da concentração de ácidos e gases insolúveis que enfraquecem a estrutura, causando o desprendimento de células únicas ou de fragmentos (Chmielewski & Frank, 2003; Trachoo, 2003), situação que pode ocorrer após 9 a 12 dias aos eventos iniciais (Sauer et al., 2002). No momento em que o biofilme atinge massa

denominada crítica, o equilíbrio dinâmico é alcançado e a camada microbiana mais externa de sua estrutura inicia a produção de células bacterianas planctônicas (Prosser et al., 1987). O processo de transferência celular do biofilme maduro para uma superfície ainda não colonizada é estratégia plausível de sobrevivência bacteriana em longo prazo (Hunt et al., 2003). O modo de desprendimento das células bacterianas é caracterizado como etapa crítica do ciclo de vida de biofilmes (Sauer et al., 2002), na qual os microrganismos liberados formarão novos biofilmes, caracterizando o ciclo de contaminações (Christensen & Characklis, 1990).

Além de ser reflexo do fluxo do meio aquoso que passa pelo local, o desprendimento, usado para descrever a liberação de células (individuais ou em grupos) de um biofilme, é evento ativo, regulado fisiologicamente (Stoodley et al., 2001), no qual múltiplas adesinas são produzidas, sendo algumas reguladas no âmbito de transcrição, permitindo que os microrganismos, de acordo com as condições ambientais, se desenvolvam na forma séssil ou planctônica, dependendo das diferenças e das influências do meio (Morales et al., 2004).

Dessa forma, deve-se enfatizar que, ainda que o biofilme não tenha atingido massa crítica ou se desenvolvido completamente, microrganismos viáveis aderidos à superfície irão apresentar a habilidade de contaminar produtos alimentícios, mesmo que o número de células presentes seja baixo ou variado dentro de determinada área (Verran, 2002). Este fenômeno é denominado potencial de biotransferência e pode ser definido como a habilidade que o microrganismo presente na superfície do equipamento, antes ou após o procedimento de higienização, possui de contaminar produtos alimentícios durante o processamento (Hood & Zottola, 1995; Wirtanen et al., 1996; Verran, 2002).

A acumulação do biofilme é processo natural que ocorre segundo um padrão sigmoidal, sendo resultado do balanço entre vários processos físicos,

químicos e biológicos, que ocorrem simultaneamente (Bott, 1993). Existem várias teorias propondo inúmeras etapas para o processo de formação de biofilmes. Entre todas as teorias consultadas, é senso comum que este parte de uma etapa de adesão inicial, seguindo vários estágios de desenvolvimento, finalizando na maturação e na liberação de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme (Mosteller & Bishop, 1993; Melo, 1994; Zottola, 1994; Lasa, 2006). Entretanto, a formação do biofilme deve, ainda, ser caracterizada como processo dinâmico, em que todas as etapas ocorrem simultaneamente na superfície, como pode ser observado na Figura 1.

O processo da formação do biofilme e seu desprendimento podem ser regulados por comunicação célula a célula e pela densidade da população formada (Morales et al., 2004). Tanto o desprendimento de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme como o desenvolvimento primário e a maturação são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica, controlados por moléculas sinalizadoras, processo este denominado *quorum sensing* (Chopp et al., 2002).

Bactérias capazes de realizar o fenômeno de *quorum sensing* liberam moléculas químicas sinalizadoras denominadas autoindutores (Waters & Bassler, 2005). Bactérias gram-negativas tipicamente produzem N-acil-homoserinas lactonas (AHL) (Dunne Junior, 2002) e as gram-positivas, oligopeptídeos (Winans & Bassler, 2002). A concentração externa dessas moléculas autoindutoras aumenta em função de elevações na densidade populacional bacteriana. Bactérias são capazes de detectar a acumulação de limiares mínimos de estimulação destes autoindutores, alterando sua expressão gênica e, por conseguinte, seu comportamento. Pela utilização desse sistema de sinalização, bactérias sincronizam comportamentos particulares em escala populacional, agindo como organismos multicelulares (Waters & Bassler, 2005).

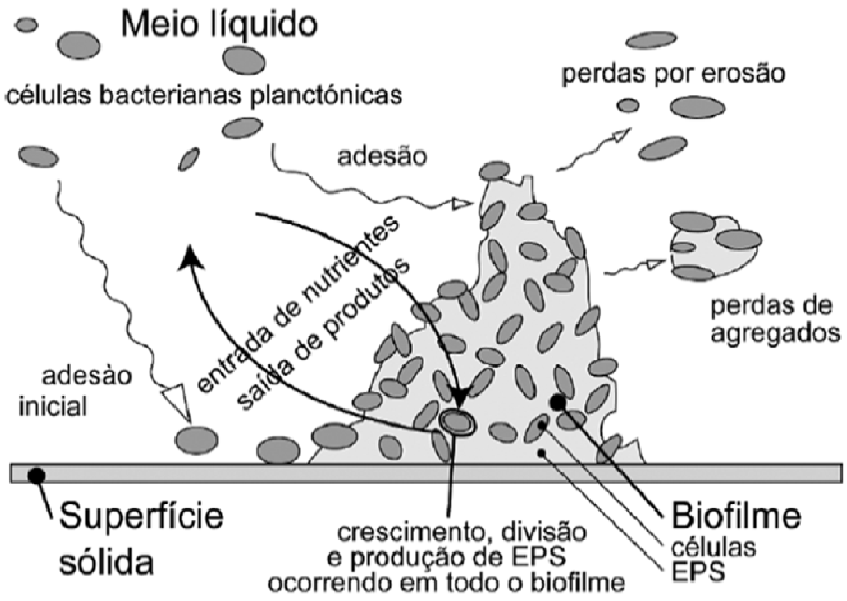


FIGURA 1 Principais etapas envolvidas no processo de formação de biofilmes microbianos. Adaptado de Xavier et al. (2003).

2.3 Mecanismos de resistência de biofilmes a agentes antimicrobianos

Uma vez estabelecidas, bactérias sésseis expressam genes em modelo que difere extremamente do de bactérias planctônicas, levando a mudanças fenotípicas (Prigent-Combaret & Lejeune, 1999). Uma dessas marcantes propriedades é o aumento da resistência de células sésseis a defesas do hospedeiro, biocidas e vários agentes físico-químicos (Costerton, 2005). Tais características proporcionam a estas células condições favoráveis de sobrevivência, o que as torna menos susceptíveis à erradicação, quando

comparadas aos mesmos microrganismos sob a forma planctônica (Morck et al., 2001).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o fenômeno da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos (Mah & O`Toole, 2001), tais como: limitações difusionais à passagem do agente pela matriz extracelular, diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos em biofilme, alterações fenotípicas das células no biofilme e desenvolvimento de mecanismos de resistência por alteração na modulação da expressão gênica celular (Beer et al., 1994; Donlan & Costerton, 2002; Gilbert & McBain, 2003). O mecanismo de *quorum sensing*, no qual bactérias produzem moléculas extracelulares para comunicar-se entre si e coordenar suas atividades, parece estar relacionado com o fenômeno da resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos, embora seu papel não esteja ainda totalmente claro (Mah & Toole, 2001).

2.4 Impactos causados pela presença de biofilmes microbianos na indústria de alimentos

Biofilmes podem ter efeitos prejudiciais ou benéficos em inúmeras áreas, tais como industrial, ambiental e médica. Frequentemente, biofilmes são relacionados a diversos problemas, como o processo de corrosão microbiologicamente induzido em tubulações, equipamentos e peças metálicas (Walker et al., 1998), contaminações em indústrias de alimentos e em sistemas de água (Flint et al., 1997), doenças periodontais (Hobson & Bolsen, 2001) e infecções hospitalares relacionadas a biomateriais (Dankert et al., 1986).

Uma vez instalados, biofilmes microbianos agem como camadas isolantes e ocasionam o processo denominado corrosão microbiologicamente induzida, prejudicando a transferência de calor entre superfícies e reduzindo a vida útil dos equipamentos (Mansfeld, 2007). Dessa forma, no setor industrial, os principais resultados, economicamente danosos, do desenvolvimento de

biofilmes são reduções no desempenho de processos e na eficiência de operação dos equipamentos e danos às superfícies sólidas onde se acumulam. Em consequência, há perdas de energia e despesas acrescidas de limpeza e manutenção por meio da substituição de peças dos equipamentos precocemente deterioradas, bem como diminuição da qualidade dos produtos (Characklis, 1990).

No que se refere aos aspectos microbiológicos, sabe-se que, mesmo com a implantação de sistemas de qualidade nas indústrias alimentícias e aplicação de efetivos agentes sanificantes, microrganismos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que entram em contato com os alimentos. A retenção e o acúmulo de microrganismos em tais ambientes contribuirão para o desenvolvimento de biofilmes (Bos et al., 2000). A adesão a superfícies pode ser realizada por microrganismos deteriorantes ou patogênicos, resultando em sérios problemas de saúde pública ou de ordem econômica (Norwood & Gilmour, 1999).

Assim, uma das consequências mais graves da má higienização nas indústrias de alimentos é a possível ocorrência de doenças de origem alimentar. Cerca de 200 doenças podem ser veiculadas pelos alimentos. Elas são provocadas por bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas de origem animal e vegetal. Bactérias representam o grupo de maior importância, sendo responsáveis pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 90% dos casos (Andrade & Macêdo, 1996).

2.5 Microrganismos envolvidos no processo de adesão e formação de biofilmes

Biofilmes podem ser formados por quase todos os tipos de microrganismos, sob condições favoráveis (McLandsborough et al., 2006). É enorme a diversidade de espécies que podem estar presentes nos biofilmes, quer

nos próprios hábitats, quer nos criados pelo homem. Microalgas, fungos, protozoários, bactérias e vírus são microrganismos frequentemente encontrados em biofilmes (Characklis, 1990).

Dentre todos os microrganismos, são as bactérias que mais frequentemente produzem biofilme, ainda que umas apresentem, naturalmente, maior aptidão que outras. Os seus reduzidos tamanhos, elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante são as principais características que fazem das bactérias excelentes organismos produtores de biofilmes (Characklis, 1990). *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* são alguns dos gêneros mais comuns de bactérias produtoras de biofilmes (Mattila-Sandholm & Wirtanen, 1992).

Na indústria de alimentos, dentre os microrganismos deteriorantes, destacam-se: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. e *Enterococcus faecium* (Leriche & Carpentier, 1995; Andrade et al., 1998). Como exemplos de microrganismos patogênicos, encontram-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Leriche & Carpentier, 1995; Smith & Fratâmico, 1995; Surman et al., 1996).

2.5.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria spp. foi descrita pela primeira vez, por Murray et al. (1926), como causadora de doenças entre cobaias de laboratório e coelhos do Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Os mesmos autores propuseram o nome de *Bacterium monocytogenes* para o novo microrganismo, devido à elevação característica nos valores sanguíneos de leucócitos

mononucleares. A partir de 1940, o gênero foi modificado para *Listerella*, em honra ao cirurgião Lord Lister. Logo em seguida, como havia um gênero vegetal assim denominado, passou a chamar-se *Listeria* (Pirie, 1940).

Por vários anos, o gênero *Listeria* continha apenas uma espécie: *L. monocytogenes.* Contudo, atualmente, o gênero é composto por 6 espécies: *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi* (Rocourt, 1999). Além da *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* são espécies já detectadas em alimentos e no ambiente (Jay, 2005). Destas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são potencialmente patogênicas (Severino, 2006).

L. monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, aeróbica facultativa, catalase positiva, oxidase negativa, halotolerante, não formadora de esporos e desprovida de cápsula. Possui motilidade, morfologia de bacilo, diâmetro de 0,4-0,5 μm, comprimento de 0,5-2,0 μm, extremidades arredondadas e flagelos peritríquios que permitem sua motilidade (Rocourt, 1999; Adams & Moss, 2004). Característica importante é sua capacidade de se desenvolver em temperaturas que variam de -0,4º a 50°C, apresentando crescimento ótimo entre 30º e 37°C (Severino, 2006).

No que diz respeito à sorologia, foram descritos 16 sorotipos, sendo 15 antígenos somáticos "O" e cinco antígenos flagelares "H". *L. monocytogenes* contém os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. A classificação sorológica, efetuada em laboratórios de referência, exige tipagem dos antígenos O e H e é utilizada, basicamente, para estudos epidemiológicos. Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b constituem mais de 90% dos microrganismos isolados em seres humanos (Jawetz et al., 1998). A grande heterogeneidade antigênica de *L. monocytogenes* pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se (Jay, 2005). Em geral,

linhagens 4b são mais frequentemente associadas a surtos, enquanto linhagens 1/2 são mais relacionadas a produtos alimentícios (Mantilla et al., 2007).

2.5.1.1 Listeriose

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, *L. monocytogenes* é considerado um dos cinco mais importantes microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos. A listeriose é uma doença de origem alimentar atípica, devido à alta gravidade, natureza não entérica e longo período de incubação (Loguercio et al., 2001). Apesar da baixa incidência, possui elevada taxa de mortalidade quando comparada às demais doenças transmitidas por alimentos de origem bacteriana (Rocourt et al., 2000).

Adquirida por meio da ingestão de alimentos contaminados, pode vir a afetar, principalmente, indivíduos imunodeprimidos, idosos, gestantes e recém-nascidos (Khelef et al., 2006). Entretanto, existem registros de surtos de listeriose caracterizados por sintomas gastrintestinais envolvendo indivíduos saudáveis (Guerra & Bernardo, 1999).

Sua manifestação ocorre como gastrenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante ao feto e septicemias, resultando em morte em 25% a 30% dos casos (Khelef et al., 2006). A listeriose é clinicamente definida quando o microrganismo é isolado a partir do sangue, do fluido cérebro-espinhal ou de qualquer outro local estéril, como a placenta e o feto. A dose infectiva para a ocorrência de listeriose é desconhecida, mas, acredita-se que varie de acordo com a linhagem e a susceptibilidade da vítima. O período de incubação é excessivamente longo, de 1 a 90 dias (Forsythe, 2005).

Embora gram-positiva, a patogenicidade de *L. monocytogenes* se expressa de maneira significativamente diferente. Ao contrário das outras doenças causadas por bactérias gram-positivas, com exceção de *Clostridium*

perfringens, a ingestão de células viáveis é necessária para que a listeriose ocorra (Jay, 2005).

Após a ingestão, *L. monocytogenes* atravessa a barreira intestinal pela invasão do epitélio, ganhando acesso ao organismo interno (Khelef et al., 2006). A invasão epitelial ocorre pela ligação de duas proteínas localizadas na superfície de *L. monocytogenes* com receptores situados na superfície das células do hospedeiro. Essas proteínas de superfície são denominadas internalina A (InlA) e internalina B (InlB). InlA possui como proteína receptora a E-caderina, uma glicoproteína transmembrana, enquanto InlB possui como receptora a Met, uma proteína pertencente à família dos receptores de tirosina quinase (Hamon et al., 2006; Cossart & Toledo-Anara, 2008). As chances de invasão do tecido intestinal dependem de uma série de fatores, que incluem número de bactérias ingeridas, susceptibilidade do hospedeiro e virulência específica do isolado (Gellin & Broome, 1989). Em seguida à disseminação através do lúmen intestinal, a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos dentro da lâmina própria (Germano & Germano, 2001; Forsythe, 2005). *L. monocytogenes* produz as enzimas catalase e superóxido dismutase, que a protegem de danos oxidativos dentro do fagócito (Forsythe, 2005).

A próxima etapa compreende a lise da membrana fagocítica por *L. monocytogenes*, a qual é causada pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fofolipases C (PLCs). A LLO é uma β-hemolisina que age formando poros na membrana fagocítica (Hamon et al., 2006) e, assim, permite que as fosfolipases atuem nos fosfolipídios de membrana (Hybiske & Stephens, 2008). *L. monocytogenes* produz dois tipos de PLCs, uma fosfotidilinositol-específica (PI-PLC) e uma foafatidilcolina-específica (PC-PLC) de amplo espectro de atuação, também conhecida como lecitinase. As PLCs, além de causarem a lise da membrana fagocítica, auxiliam na invasão célula-célula (Smith et al., 1995; Vazquez-Boland et al., 2001). Após a lise da membrana fagocítica, a bactéria é

liberada no citoplasma da célula do hospedeiro, onde se multiplica rapidamente (Germano & Germano, 2001).

L. monocytogenes possui uma proteína de superfície denominada ActA, a qual é responsável pela associação da bactéria aos filamentos de actina no citoplasma do hospedeiro. A polimerização da actina forma uma "cauda" que permite o movimento bacteriano intra e intercelular (Dussurget et al., 2004; Lambrechts et al., 2008). A capacidade de invasão célula-célula caracteriza a habilidade bacteriana de atravessar as mais seguras barreiras do hospedeiro humano, responsável pelas diversas manifestações clínicas causadas por esta infecção (Khelef et al., 2006). *L. monocytogenes* penetra no citoplasma das células adjacentes, repete o ciclo de fuga da dupla membrana fagocítica formada e se multiplica (Forsythe, 2005). Dessa forma, é denominada bactéria intracelular facultativa. Seu ciclo de vida reflete sua marcante adaptação à sobrevivência intracelular e multiplicação em macrófagos e outros tipos celulares (Khelef et al., 2006). *L. monocytogenes* pode se disseminar pela corrente sanguínea, causando septicemia ou ganhar acesso ao cérebro e, provavelmente, migrar da placenta ao feto em mulheres grávidas (Forsythe, 2005). Na Figura 2 encontram-se os diferentes estágios do ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*.

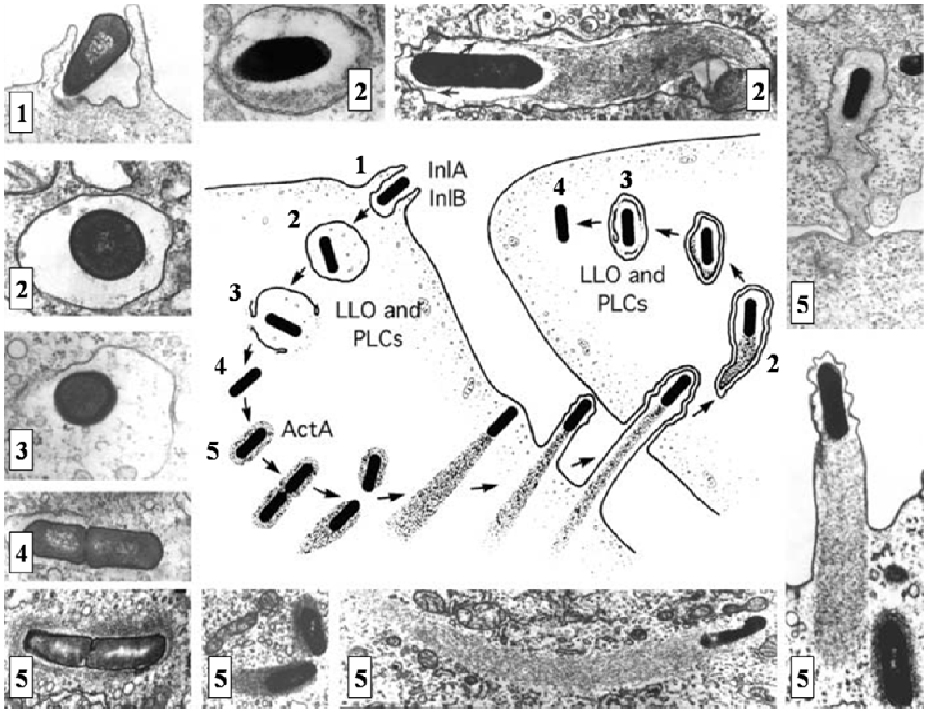


FIGURA 2 Eletromicrografias de transmissão e desenho dos estágios do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. Adaptado de Tilney & Portnoy (1989) e Portnoy et al. (2002). (1) A penetração de *Listeria monocytogenes* no epitélio intestinal ocorre pela atuação de duas proteínas de superfície: internalina A (InlA) e internalina B (InlB). (2) Em seguida, *Listeria monocytogenes* é fagocitada por macrófagos do hospedeiro. (3) A lise da membrana fagocítica ocorre pela atuação da listeriolisina O (LLO) e de fosfolipases C (PLCs). (4) A bactéria ganha acesso ao citoplasma celular. (5) O movimento inter e intracelular ocorre pela polimerização de uma cauda de actina no citoplasma do hospedeiro, pela ação da proteína de superfície ActA.

2.5.1.2 Ocorrência em alimentos e superfícies de indústrias alimentícias

Do ponto de vista ecológico, espécies de *Listeria* foram inicialmente isoladas do solo, poeira, água, esgoto, vegetais e silagem (Hofer & Póvoa, 1984). Durante muito tempo, isolados clínicos do gênero *Listeria* eram raros e a epidemiologia da doença pouco conhecida (Seeliger, 1972). Entretanto, a partir do final dos anos 1970, uma série de surtos na América do Norte e na Europa estabeleceu a listeriose como importante infecção de origem alimentar (Fleming et al., 1985). Na atualidade, os representantes patogênicos do gênero *Listeria* adquiriram extraordinária importância devido à sua veiculação por alimentos (Hofer, 2001; Severino, 2006).

Apesar de ser frequentemente encontrada em alimentos crus de origem vegetal e animal, *L. monocytogenes* também pode ser isolada de alimentos cozidos, devido a contaminações durante o processamento industrial. Mesmo quando o patógeno está presente em pequenas quantidades no alimento inicialmente contaminado, sua capacidade de se multiplicar durante a estocagem sob refrigeração permite que seu número atinja doses infectantes. Dentre os principais alimentos associados à listeriose de origem alimentar estão o leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, carnes e derivados, aves, peixes e frutos do mar (Buchanan et al., 1989; Farber & Peterkin, 1991).

No Brasil existem diversos registros da presença de *L. monocytogenes* em leite, derivados lácteos e carnes, evidenciando a importância desses alimentos na cadeia epidemiológica de transmissão do patógeno no país (Destro et al., 1991; Moura et al., 1993).

Pesquisas mais recentes, realizadas visando detectar *L. monocytogenes* em alimentos no Brasil, indicam sua presença em leite cru e leite pasteurizado (Catão & Ceballos, 2001), queijo de coalho (Branco et al., 2003; Duarte et al., 2005), queijo artesanal (Zaffari et al., 2007), queijo minas frescal (Silva et al., 2003); blanquet e presunto de peru fatiados (Araújo et al., 2002), carne bovina

crua moída (Mantilla et al., 2007), linguiça frescal (Silva et al., 2004), salame (Degenhardt & Sant'anna, 2007), mortadela (Bersot et al., 2008), carcaça suína (Santos et al., 2005), salmão gravlax (Cruz et al., 2008) e dieta enteral (Pinto et al., 2004).

Apesar das melhorias nas condições higiênico-sanitárias no processamento de alimentos em países industrializados, surtos de listerioses originados pelo consumo de alimentos contaminados ainda ocorrem e asseguram que o controle efetivo de *L. monocytogenes* mostra-se ser um desafio (Harvey et al., 2007). Estes têm sido relacionados, principalmente, à ingestão de alimentos que não necessitam de tratamento térmico antes de serem consumidos, os denominados alimentos prontos para o consumo (Tompkin, 2002).

Alimentos crus não são a maior fonte de contaminação por *L. monocytogenes*. Ela ocorre durante o processamento e equipamentos agem como os principais reservatórios (Dauphin et al., 2001; Vogel et al., 2001). Assim, a ocorrência de surtos, bem como de casos esporádicos causados por esta bactéria, pode ser atribuída ao aumento dos fatores de virulência, melhor adaptação à sobrevivência em alimentos, ampla distribuição no ambiente e ou aumento da habilidade de sobrevivência em ambientes de processamento de alimentos através de biofilmes (Chae et al., 2006).

Neste contexto, *L. monocytogenes* é de grande interesse na indústria alimentícia, uma vez que inúmeros estudos têm demonstrado sua capacidade de persistência no ambiente, algumas vezes durante anos (Miettinen et al., 1999; Bagge-Ravn et al., 2003). Sabe-se que esta persistência pode ser resultado da adaptação ambiental de certos subtipos do microrganismo, de limpeza e sanificação inadequadas dos equipamentos ou da habilidade do microrganismo em desenvolver tolerância a alguns dos produtos utilizados no procedimento de higienização (Gram et al., 2007).

L. monocytogenes pode ser introduzida em indústrias de processamento de alimentos, principalmente pela matéria-prima contaminada. Uma vez em contato com equipamentos e utensílios, possui capacidade de rápida adesão a superfície e desenvolvimento do biofilme devido à presença de flagelo (Lunden et al., 2002). Uma vez aderida, *L. monocytogenes* torna-se fonte de contaminação microbiológica do alimento que passar pelo local e entrar em contato com a superfície contaminada.

2.6 Controle e remoção de biofilmes microbianos na indústria de alimentos

2.6.1 Higienização

A higienização, na indústria de alimentos, visa, basicamente, à preservação da pureza, à palatabilidade e à qualidade microbiológica dos alimentos, auxiliando na obtenção de produtos que possuam, além das qualidades nutricionais e sensoriais, boas condições higiênico-sanitárias, não oferecendo riscos à saúde do consumidor. Dessa forma, contribui decisivamente para a produção de alimentos dentro de padrões microbiológicos recomendados pela legislação, possuindo papel relevante quando se observam os aspectos econômicos e comerciais (Andrade & Macêdo, 1996).

Nas indústrias de alimentos, a higienização é dividida em duas etapas muito bem definidas: limpeza e sanificação. A limpeza tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, gorduras e sais minerais. A sanificação, por sua vez, tem como objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de deteriorantes em níveis considerados seguros. A limpeza reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios, por isso a sanificação é indispensável (Andrade & Macêdo, 1996). A limpeza é responsável pela remoção de até 99,9% das partículas indesejáveis; o restante 0,01% inclui os microrganismos capazes de deteriorar os alimentos ou causar

toxinfecções alimentares aos indivíduos que os ingerem (Fujihara & Sylvio, 2003).

Entretanto, após a limpeza, o número de microrganismos sobreviventes ainda é elevado, o que torna a sanificação procedimento obrigatório. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (1988), por meio da Portaria n° 15, de 23 de agosto de 1988, define sanificantes ou desinfetantes como formulações que têm na sua composição substâncias microbicidas que apresentam efeito letal sobre microrganismos não esporulados. Os sanificantes mais utilizados em superfícies e equipamentos e utensílios nas indústrias alimentícias brasileiras são aqueles que possuem princípios ativos dos grupos: quaternários de amônio, compostos inorgânicos liberadores de cloro ativo, compostos orgânicos liberadores de cloro ativo, compostos à base de ácido peracético, iodo e derivados.

Os agentes sanificantes físicos ou químicos devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de microrganismos deteriorantes em níveis aceitáveis, como, por exemplo, 0,3 Log UFC.cm^{-2} de microrganismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização (*American Public Health Association* - APHA, 1992).

A natureza da superfície é fundamental para a eficiência do processo de higienização. Dentre os materiais utilizados na construção de equipamentos e utensílios, encontram-se aço inoxidável, ferro, alumínio, plástico, vidro, fórmica, polipropileno, polietileno, policarbonato e borracha (Andrade & Macêdo, 1996; Chmielewski & Frank, 2003). O aço inoxidável apresenta superfície impermeável e elevada facilidade de higienização. Entretanto, é um material relativamente caro e certos tipos podem ser corroídos por compostos halogênios (Marriot, 1989). Todavia, com o passar do tempo, as superfícies de aço inoxidável apresentam melhores propriedades higiênicas, resistindo aos danos causados pelos métodos de limpeza e sanificação (Kumar & Anand, 1998).

Nas indústrias alimentícias, o aço inoxidável é largamente empregado por apresentar características, como resistência a temperaturas baixas e altas; resistência à corrosão; baixa migração iônica; superfície lisa e pouco porosa, o que dificulta a aderência e retenção de microrganismos e neutralização em relação aos alimentos, impedindo que as propriedades organolépticas dos alimentos sejam alteradas (Gândara & Oliveira, 2000). Entretanto, as superfícies de aço inoxidável utilizadas em plantas e equipamentos de manipulação, estocagem ou processamento de alimentos são reconhecidas como as principais fontes de contaminação microbiana (Wong, 1998; Chmielewski & Frank, 2003).

2.6.2 Novas alternativas

2.6.2.1 Óleos essenciais

O metabolismo dos seres vivos compreende os metabólitos primários e os metabólitos secundários. Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas garantem a essas funções biológicas de perpetuação e defesa (Santos, 2004). A regulação do metabolismo secundário depende da capacidade genética da planta em responder a estímulos internos ou externos e da existência desses estímulos no momento apropriado (Martins et al., 2003). Os vegetais, em relação ao metabolismo secundário, possuem elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (Poser & Mentz, 2001).

Os óleos essenciais são formados a partir de vias metabólicas secundárias e podem ser definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, que ocorrem em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas,

frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (Simões & Spitzer, 2004).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, e origina os aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Exemplos de compostos aromáticos originados do metabolismo secundário são os fenilpropanoides, que derivam do ácido cinâmico, originado da fenilalanina a partir da ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) e apresentam uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligados ao anel aromático (Figura 3) (Santos, 2004).

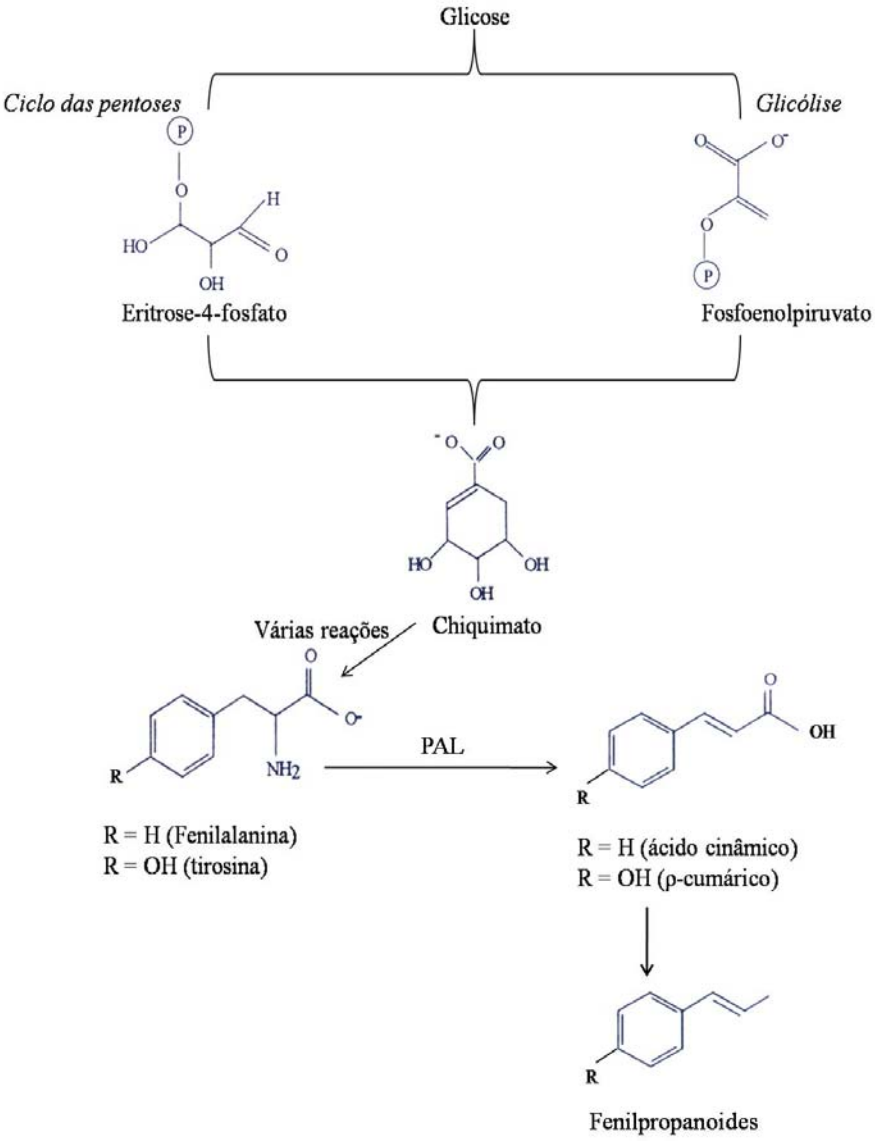


FIGURA 3 Biossíntese de fenilpropanoides (Santos, 2004).

O acetato, por sua vez, fornece as unidades acetila que compõem o intermediário reativo, acetil-CoA, o verdadeiro precursor de vários grupos de substâncias, como terpenos. Na biossíntese de terpenos, forma-se, inicialmente, o mevalonato, a partir da condensação de uma unidade de acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Este é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP), ou isopreno ativo, unidade básica da formação de terpenos. A polimerização do mevalonato vai originar moléculas de cadeias carbonadas crescentes de cinco em cinco átomos de carbono. A molécula de IPP e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) formam *trans*-geranil-pirofosfato (GPP), a partir do qual se formam os terpenos (Figura 4). Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (C10) e os sesquiterpenos (C15) (Santos, 2004).

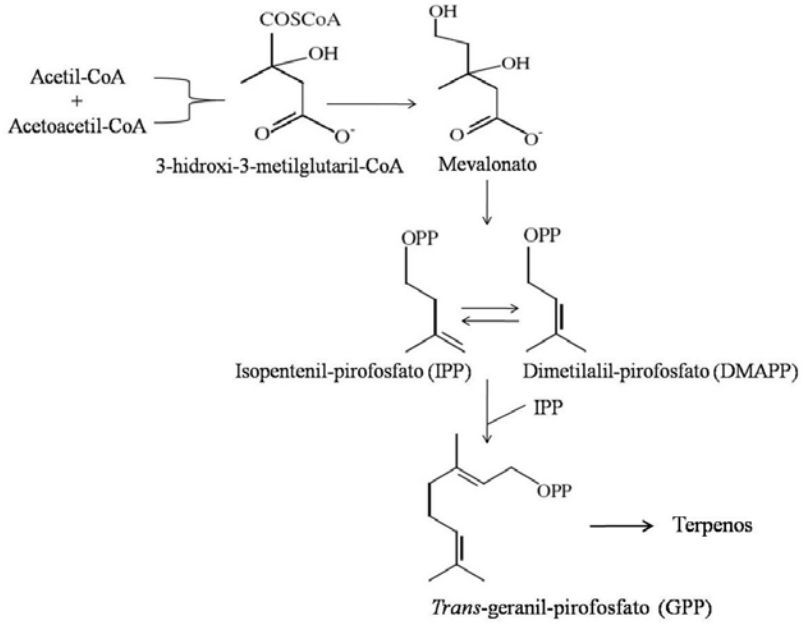


FIGURA 4 Biossíntese de terpenos (Santos, 2004).

Segundo Wanke et al. (2001), uma rota via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) é também responsável pela biossíntese de terpenos (Figura 5). Nesta rota, piruvato e D-gliceraldeído-3-fosfato, produzidos no metabolismo primário, formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato que, após sucessivas reações, origina tanto IPP como DMAPP. Diferentemente da via do mevalonato, que ocorre no citoplasma da célula, a via DXPS ocorre nos cloroplastos.

Na natureza, 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 pólens e sementes ou repelir aqueles indesejáveis. Pelas propriedades apresentadas na natureza, têm sido amplamente aplicados. Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, 300 dos quais são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêutica, agronômica, de alimentos, sanitária, de cosméticos e de perfumaria (Bakkali et al., 2008).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas diz respeito, principalmente, a danos estruturais e funcionais à membrana citoplasmática (Sikkema et al., 1994, 1995). Como são tipicamente lipofílicos, os óleos essenciais se acumulam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, conferindo característica de permeabilidade (Sikkema et al., 1994; Bakkali et al., 2008). A permeabilidade das membranas celulares é dependente da sua composição e da hidrofobicidade dos solutos que a atravessam (Sikkema et al., 1995), de maneira que a resistência bacteriana frente a óleos essenciais parece estar relacionada à habilidade de partição dos componentes dos mesmos na fase lipídica da membrana (Lambert et al., 2001).

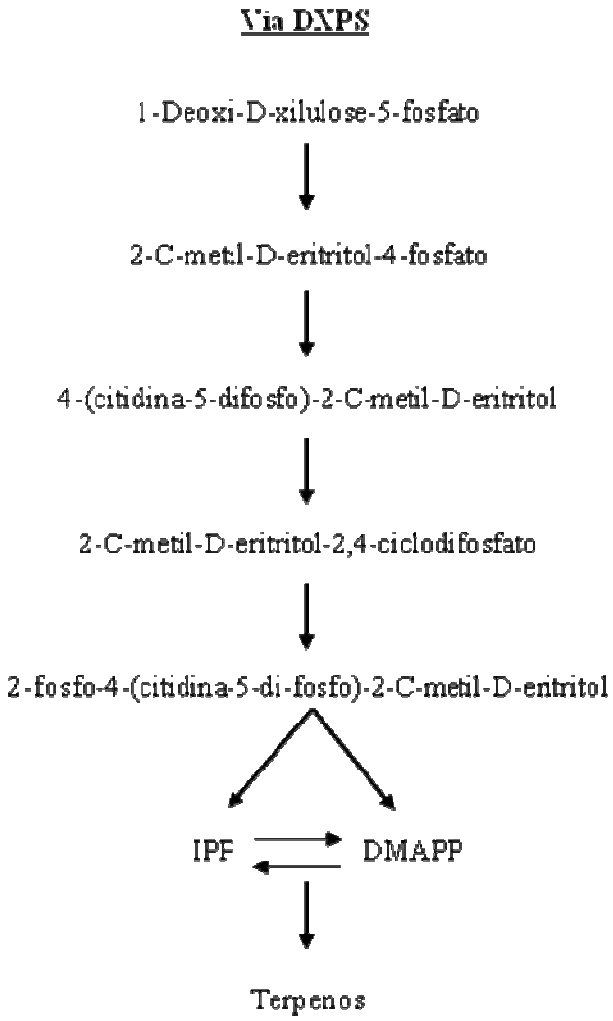


FIGURA 5 Biossíntese dos terpenos pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). Adaptado de Wanke et al. (2001).

Em bactérias, a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de metabólitos e íons, como íons potássio e fosfato (Lambert et al., 2001; Bakkali et al., 2008). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (Sikkema et al., 1994; Gill & Holley, 2006).

Outras alterações de natureza antibacteriana devido à atuação de óleos essenciais são a coagulação do citoplasma (Gustafson et al., 1998) e a danificação de proteínas embebidas na membrana citoplasmática (Knobloch et al., 1989; Ultee et al., 1999). Enzimas, tais como ATPases, estão localizadas na membrana citoplasmática e encontram-se envoltas por moléculas de lipídeos. Dois possíveis mecanismos são propostos para a ação de óleos essenciais em relação a proteínas da membrana citoplasmática. Moléculas lipofílicas capazes de se acumular na bicamada lipídica podem vir a danificar a interação lipídeo-proteína. Entretanto, a interação direta de compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas pode também ocorrer (Juven et al., 1994; Sikkema et al., 1995).

Os principais mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana, bem como os locais onde estes ocorrem, estão ilustrados na Figura 6.

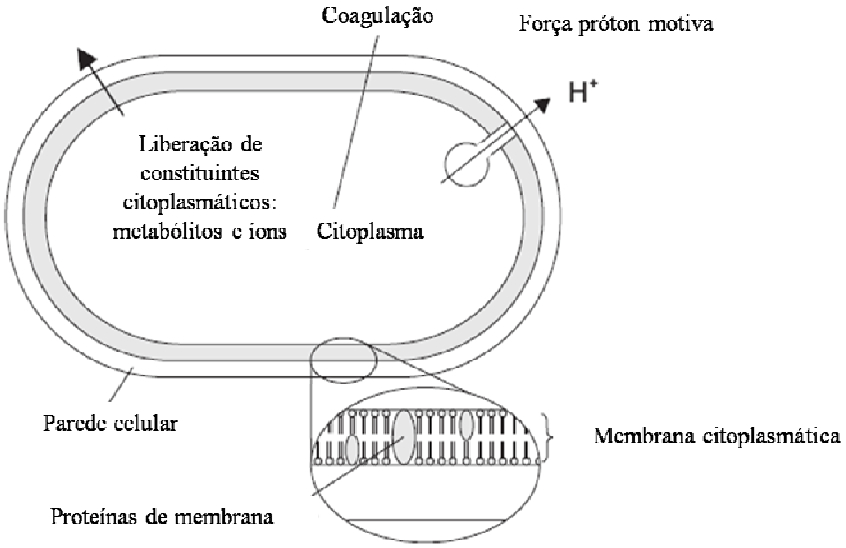


FIGURA 6 Principais locais e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana. Adaptado de Burt (2004).

Recentemente, a atividade antibacteriana de óleos essenciais vem sendo avaliada frente a biofilmes, visando possível utilização desses compostos como agentes sanificantes na indústria de alimentos. Os resultados encontrados nos trabalhos já realizados são promissores, entretanto, ainda divergem entre si, demonstrando a necessidade de realização de mais estudos sobre o assunto (Chorianopoulos et al., 2008).

Knowles et al. (2005) avaliaram a ação antimicrobiana do carvacrol em diferentes estágios do biofilme multiespécie desenvolvido por *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium. Pulsos de carvacrol de 1,0 mmol.h^{-1} reduziram o número de células de *S. aureus* cerca de 2,5 Log UFC.biofilme^{-1} durante os primeiros estágios de formação, causando redução significativa da população no biofilme maduro. Pulsos iniciais de carvacrol causaram redução de 3 Log

UFC.biofilme^{-1} de *Salmonella* Typhimurium, e pulsos adicionais reduziram significativamente a população (1 a 2 Log UFC.biofilme^{-1}) durante o desenvolvimento. Estudos comparativos com sanificante comercial à base de peróxido revelaram que este apresentou-se mais biocida do que o carvacrol nos estágios iniciais de formação do biofilme. Entretanto, no biofilme maduro, pulsos periódicos de carvacrol (1,0 mmol.h^{-1}) promoveram maior redução, quando comparado ao sanificante comercial. O desenvolvimento do biofilme multiespécie iniciou-se com a formação de microcolônias sob a influência de baixas concentrações de carvacrol (1,0 mmol.h^{-1}), entretanto, não ocorreu o desenvolvimento para o estado maduro. Em elevadas concentrações de carvacrol (5,0 mmol.h^{-1}), o desenvolvimento do biofilme não ocorreu, mostrando a efetividade do carvacrol no controle natural da formação do biofilme multipespécie.

Lebert et al. (2007) realizaram estudo objetivando investigar a efetividade de soluções bactericidas sobre o biofilme monoespécie e multiespécie de *P. fragi*, *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus succinus* e *Lactobacillus sakei*, formados sobre a superfície de filtros de fibra de vidro. Dois constituites de óleos essenciais (timol e eugenol) foram utilizados, bem como o óleo essencial de *Satureja thymbra*. Timol e eugenol foram testados nas concentrações de 1, 4, 7 e 10 mM, enquanto o óleo essencial foi testado nas concentrações de 1% e 2%. Os tempos de contato e temperatura utilizados foram 15 minutos a 40°C e 60 minutos a 16°C. Timol e eugenol não apresentaram nenhum efeito sobre o biofilme multiespécie. Entretanto, o óleo essencial, na concentração de 2%, provocou redução de 5 Log UFC.filtro^{-1} do biofilme formado por *P. fragi* e *E. coli*; 4 Log UFC.filtro^{-1} do biofilme formado por *S. equorum*; 2,3 Log UFC.filtro^{-1} do biofilme formado por *S. aureus* e *L. monocytogenes* e 0,5 Log UFC.filtro^{-1} do biofilme formado por *L. sakei*.

Sandasi et al. (2008) avaliaram o efeito de cinco constituintes de óleos essenciais (α-pineno, 1,8-cineol, (+)-limoneno, linalol e geranil acetato) sobre o biofilme monoespécie formado por *L. monocytogenes* ATCC 19111 e *L. monocytogenes* CI001. Ao contrário do esperado, nenhum dos compostos utilizados apresentou atividade antibacteriana. O tratamento do biofilme formado após 6 horas com 1 $mg.mL^{-1}$ dos diferentes componentes de óleos essenciais provocou aumento da formação do biofilme.

Chorianopoulos et al. (2008) compararam a atividade antimicrobiana, sobre biofilmes monoespécies e multiespécies, do óleo essencial (1% v/v, pH 6,2), do hidrolato (100% v/v) e do produto de decocção (100% v/v) de *S. thymbra* contra um sanificante químico alcalino (hidróxido de sódio, pH 11) e dois sanificantes químicos ácidos (ácido hidroclórico e ácido láctico, pH 3). As espécies utilizadas foram *Staphylococcus simulans*, *Lactobacillus fermentum*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica* e *L. monocytogenes*. Os tratamentos sanificantes foram aplicados durante 60 e 180 minutos, a 16°C. O óleo essencial e o hidrolato foram os tratamentos mais efetivos, apresentando efeito bactericida suficiente para a remoção dos biofilmes formados em superfície de aço inoxidável. Não foram observadas diferenças significativas entre a redução do biofilme nos dois tempos de contato utilizados, tanto para os biofilmes monoespécies como para os mutliespécies. Segundo os autores, o uso de agentes antimicrobianos naturais pode fornecer caminhos alternativos para a sanificação de superfícies industriais contaminadas por microrganismos.

2.7 *Cymbopogon* sp.

2.7.1 *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.

Espécie originária do sudoeste asiático e distribuída atualmente nas regiões tropicais e subtropicais (Gomes & Negrelle, 2003). No Brasil, a produção ocorre destacadamente nas regiões Sul e Sudeste (Gomes et al., 2007).

Pertence à família Poaceae e é popularmente conhecida como capim-limão, capim-santo, capim-cidreira, capim-cheiroso, capim-de-cheiro (Braga, 1976), erva-cidreira, capim-catinga, capim-cidrão, capim-cidrilho, capim-cidró e capim-ciri (Costa et al., 2005). É uma planta perene, tipicamente herbácea e formadora de touceiras compactas (Figura 7) (Pinto et al., 2000).

FIGURA 7 Aspecto geral da espécie *Cymbopogon citratus*.

As folhas apresentam odor aromático agradável, característico de limão, sabor aromático e ardente, e coloração verde-pálida (Farmacopeia..., 1959). A medicina popular utiliza o chá preparado a partir de suas folhas como calmante, analgésico em dores de estômago, abdominais e de cabeça, antifebril, antirreumático, carminativo, antitussígeno, diurético, diaforético e em distúrbios digestivos (Costa et al., 2005).

Sua maior importância econômica reside na produção do seu óleo essencial, rico em citral e conhecido internacionalmente como óleo essencial de *lemongrass* (Ming et al., 1996; Lewinsohn et al., 1998; Costa et al., 2005). O

óleo essencial de *C. citratus* é amplamente utilizado como agente aromatizante na indústria de perfumaria e cosmética, na preparação de sabonetes, colônias e desodorantes, bem como na indústria de alimentos e na indústria química para a obtenção do citral, que é utilizado como matéria-prima para a síntese de ianonas e vitamina A (Guenther, 1992; Lewinsohn et al., 1998). Também é empregado como repelente de insetos (Simões et al., 1986), possui atividade antibacteriana, atua na diminuição da atividade motora e no aumento do período de sono; é anticonvulsivante, antiespasmódico e analgésico (Lorenzi & Matos, 2002).

Seu óleo essencial é basicamente constituído de citral (70% a 85% v/v) (Ferreira & Fonteles, 1989), mistura isomérica de neral (citral B ou isômero Z) (Figura 6A) e geranial (citral A ou isômero E) (Figura 6B) (El Fattah et al., 1992). Além destes, pode conter mirceno e outros compostos minoritários, como, por exemplo, geraniol, cimbopogol, limoneno e dipenteno (Martins et al., 2003).

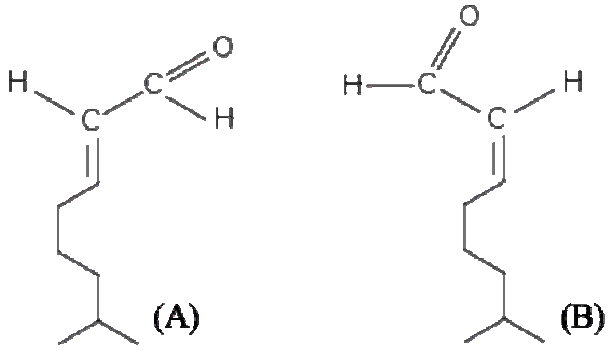


FIGURA 8 Estruturas químicas do neral (A) e do geranial (B).

2.7.2 *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle

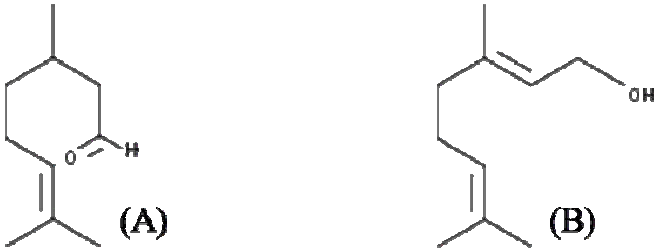
Espécie originária do Ceilão e Sul da Índia e, atualmente, encontrada em países de clima tropical e subtropical. É uma erva perene e cespitosa (Figura 9), popularmente conhecida no Brasil como citronela, citronela-do-ceilão, lenabatu-grass e cidró-do-paraguai (Castro & Ramos, 2003).

FIGURA 9 Aspecto geral da espécie *Cymbopogon nardus*.

C. nardus é utilizado como planta aromática para fins de perfumaria, para afugentar insetos do lar e de grãos armazenados (Castro & Ramos, 2003). O chá de *C. nardus* é utilizado na Indonésia como calmante e digestivo (Craveiro et al., 1981). As partes utilizadas são as folhas, das quais é também obtido seu óleo essencial (Castro & Ramos, 2003).

O óleo essencial de *C. nardus* é utilizado na fabricação de perfumes e cosméticos, sendo repelente aos insetos, com ação fungicida e bactericida (Billerbeck et al., 2001; Trongtokit et al., 2005; Wong et al., 2005). Possui alto teor de citronelal (Figura 7A) e geraniol (Figura 7B). O citronelal é utilizado

como material básico para a síntese de importantes compostos químicos denominados iononas e para a síntese de vitamina A (Craveiro et al., 1981).



FIGUA 10 Estruturas químicas do citronelal (A) e do geraniol (B).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2. ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. Determina que o registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana seja procedido de acordo com as normas regulamentares. **Diário Oficial Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 5 set. 1988.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Hanover: EPS Group, 1992. 1208 p.

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

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos.** São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

ARAÚJO, P. C. C.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. de; CARVALHO, J. C. A. do P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 19-25, 2002.

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

BAGGE-RAVN, D.; NG, Y.; HJELM, M.; CHRISTIANSEN, J. N.; JOHANSEN, C.; GRAM, L. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries: analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 87, n. 3, p. 239-250, Nov. 2003.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BAKKE, R.; TRULEAR, M. G.; ROBINSON, J. A.; CHARACKLIS, W. G. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, n. 12, p. 1418-1424, Dec. 1984.

BEER, D. de; SRINIVASAN, R.; STEWART, P. S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 12, p. 4339-4344, Dec. 1994.

BERSOT, L. dos S.; GILLIO, C.; TAVOLARO, P.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. de M.; DESTRO, M. T. Behaviour of *l. monocytogenes* in sliced, vacuum-packed mortadella. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 514-516, July/Sept. 2008.

BILLERBECK, V. G. de; ROQUES, C. G.; BESSIÈRE, J. M.; FONVIEILLE, J. L.; DARGENT, R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 1, p. 9-17, Jan. 2001.

BOS, R.; MEI, H. C. van der; GOLD, J.; BUSSCHER, H. J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 189, n. 2, p. 311-315, Aug. 2000.

BOTT, T. R. Aspects of biofilm formation and destruction. **Corrosion Reviews**, London, v. 11, p. 1-24, 1993.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: UFC, 1976. 540 p.

BRANCO, M. A. de A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. de F.; SILVA, M. C. D. da; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jul./dez. 2003.

BUCHANAN, R. L.; STAHL, H. G.; BENCIVENGO, M. M.; CORRAL, F. del. Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel Johnson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seefood. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 3, p. 599-603, Mar. 1989.

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

BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. van der. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. In: ALLISON, D.; GILBERT, P.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; WILSON, M. (Ed.). **Community structure and co-operation in biofilms**. Cambridge: Cambridge University, 2000. p. 25-36. (SGM Symposium, 59).

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

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. , capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 23 p.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., total coliform, fecal coliform and *E. coli* on raw and pasteurized milk on a dairy industry, Paraiba, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 281-287, Sept./Dec. 2001.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; ROBERT, M. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 3, p. 250-259, June 2006.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G.; ADRIÃO, A.; FALEIRO, L.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C.; ANDREW, P. W.; TENREIRO, R. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial–temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 52-63, May 2007.

CHAMBERLAIN, A. H. L. The role of adsorbed layers in bacterial adhesion. In: MELO, L. F.; BOTT, T. R.; FLETCHER, M.; CAPDEVILLE, B. (Ed.).

Biofilms: science and technology. Netherlands: Kluwer Academic, 1992. p. 59-67.

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

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

CHAVANT, P.; GAILLARD-MARTINIE, B.; TALON, R.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 605-612, Mar. 2007.

CHENG, C.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; BRYERSAND, J. D.; JIANG, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 29, p. 4192-4199, Oct. 2007.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CHOPP, D. L.; KIRISITS, M. J.; MORAN, B.; PARSEK, M. R. A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 29, p. 339-346, 2002.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. M.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, June 2008.

CHRISTENSEN, B. E.; CHARACKLIS, W. G. Physical and chemical properties of biofilms. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Ed.). **Biofilms**. New York: J. Wiley and Sons, 1990. p. 93-130.

COSSART, P.; TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, p. 1041-1050, 2008.

COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; CARDOSO, J. C. W.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-959, out./dez. 2005.

COSTERTON, J. W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 437, p. 7-11, Aug. 2005.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 435-464, Oct. 1987.

COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K. J. How bacteria stick. **Scientific American**, New York, v. 238, n. 1, p. 86-95, Jan. 1978.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, Oct. 1995.

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

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

CRUZ, C. D.; SILVESTRE, F. A.; KINOSHITA, E. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 375-383, June 2008.

DANKERT, J.; HOGT, A. H.; FEIJEN, J. Biomedical polymers: bacterial adhesion, colonization and infection. **CRC Critical Reviews in Biocompatibility**, Boca Raton, v. 2, p. 219-301, 1986.

DAUPHIN, G.; RAGIMBEAU, C.; MALLE, P. Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 51-61, Feb. 2001.

DEGENHARDT, R.; SANT'ANNA, E. S. Pesquisa de *Listeria sp* em embutidos cárneos fermentados produzidos na região meio-oeste de Santa Catarina, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisas em Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 133-140, jan./jun. 2007.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 110-112, 1991.

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

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, July/Sept. 2005.

DUNNE JUNIOR, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 15, n. 2, p. 155-166, Apr. 2002.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 58, p. 587-610, Oct. 2004.

EL FATTAH, M.; EL ZAHWEY, A.; HARIDY, I. M.; EL DEEB, S. A. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofiya Journal Agriculture Research**, Alexandria, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, London,, v. 55, p. 476-511, 1991.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 606 p.

FERREIRA, M. S. C.; FONTELES, M. C. Aspectos etnobotânicos e farmacológicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim-limão). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 4, p. 94-97, 1989.

FLEMING, D. W.; COCHI, M. D.; MACDONALD, K. L.; BRONDUM, J.; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, London, v. 312, p. 404-407, 1985.

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

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

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant description. **Biofouling**, Abingdon, v. 11, p. 81-97, 1997.

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

FUJIHARA, R. M.; SYLVIO, S. B. Limpeza e desinfecção de plantas de processamento. In: CONTRERAS, C. C.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B.; MIYAGUSKU, L. (Ed.). **Higiene e sanitização na indústria de carne e derivados**. São Paulo: Varela, 2003. p. 7-16.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e feitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 1-14, abr. 2000.

GEHRKE, T.; TELEGDI, J.; THIERRY, D.; SAND, W. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2743-2747, July 1998.

GELLIN, B. G.; BROOME, C. V. Listeriosis. **JAMA**, Chicago, v. 261, n. 9, p. 1313-1320, 1989.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. 655 p.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence os antibiotic resistence. **Clinical Microbiology Reviews,** Washington, v. 16, n. 2, p. 189-208, Apr. 2003.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-9, Apr. 2006.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137-144, jul./dez. 2003.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B.; DIMAS FILHO, L. Caracterização da produção de capim-limão no estado do Paraná, Brasil. **Scientia Agraria,** Curitiba, v. 8, n. 4, p. 385-390, 2007.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 2007.

GUENTHER, E. **The essential oils**: individual essential oils of the plant families. Malabar: Krieger, 1992. 3894 p.

GUERRA, M. M.; BERNARDO, F. M. A. Relevância sanitária de *Listeria monocytogenes* nos produtos lácticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, Lisboa, v. 94, n. 530, p. 142-148, 1999.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; WYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters on Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 194-198, 1998.

HAMON, M.; BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, n. 6, p. 423-434, June 2006.

HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 4, p. 380-392, June 2007.

HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; HENTZER, M.; STERNBERG, C.; GIVSKOV, M.; ERSBØLL, B. K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. **Microbiology**, London, v. 146, n. 10, p. 2395-2407, Oct. 2000.

HOBSON, D. W.; BOLSEN, K. Methods of the testing oral and topical antiseptics and antimicrobials. In: BLOCK, S. S. (Ed.). **Disinfection, sterilization and preservation**. Lippincott: Williams & Wilkins, 2001. p. 1329-1359.

HOFER, E. Três decênios de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, P. A.; BOBBIO, J. L.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M. (Ed.). **Ciência de alimentos**: avanços e perspectivas. Campinas: Unicamp, 2001. p. 111-115.

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

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

HORAN, N. J.; ECCLES, C. R. Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. **Water Research**, New York, v. 20, p. 1427-1432, 1986.

HUNT, S. M.; HAMILTON, M. A.; SEARS, J. T.; HARKIN, G.; RENO, J. A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms. **Microbiology**, London, v. 149, n. 5, p. 1155-1163, May 2003.

HYBISKE, K.; STEPHENS, R. S. Exit strategies of intracellular pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 2, p. 99-110, Feb. 2008.

JAHN, A.; NIELSEN, P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. **Water Science and Technology**, London, v. 32, n. 8, p. 157-164, 1995.

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

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

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

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 6, p. 626-631, June 1994.

KHELEF, N.; LECUIT, M.; BUCHRIESER, C.; CABANES, D.; DUSSURGET, O.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. 3. ed. New York: Springer, 2006. p. 404-476.

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

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEIS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Winston-Salem, v. 1, n. 3, p. 119-128, May/June 1989.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803, Feb. 2005.

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

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LAMBRECHTS, A.; GEVAERT, K.; COSSART, P.; VANDEKERCKHOVE, J.; TROYS, M. van. *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 220-227, May 2008.

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

LASA, I.; POZO, J. L. del; PENADÉS, J. R.; LEIVA, J. Bacterial biofilms and infection. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, Pamplona, v. 28, n. 2, p. 163-175, 2005.

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

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but Nonculturable *Salmonella typhimurium* in Single- and Binary-Species Biofilms in Response to Chlorine Treatment. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 11, p. 1186-1191, Nov. 1995.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; JOEL, D. M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, p. 35-39, 1998.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P. da; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M. da; VARGAS, A. C. de. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan./fev. 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.

LUNDEN, J. M.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 7, p. 1129-1133, July 2002.

LYNCH, A. S.; ROBERTSON, G. T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 59, p. 415-428, 2008.

MACHADO, S. M. de O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. 129 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho, Braga.

MAH, T. H. C.; TOOLE, G. A. o'. Mechanisms of biofilm resistence to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, Japan, v. 9, p. 34-38, 2001.

MALONE, J. A.; CALDWELL, D. E. Evaluation of surface colonization kinetics in continuous culture. **Microbial Ecology**, New York, v. 9, p. 299-305, 1983.

MANSFELD, F. The interation of bacteria and metal surfaces. **Electrochimica Acta**, New York, v. 52, p. 7670-7680, 2007.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B. S.; GOUVÊA, R. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1225-1230, jul./ago. 2007.

MARRIOT, N. G. Cleaning compounds. In: _____. **Principle of food sanitation**. New York: Avi, 1989. cap. 5, p. 65-68.

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

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 220 p.

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

McLANDSBOROUGH, L.; RODRIGUEZ, A.; PÉREZ-CONESA, D.; WEISS, J. Biofilms: at the interface between biophysic and microbiology. **Food Biophysics**, v. 1, n. 2, p. 94-114, June 2006.

MELO, L. F. Biofilmes e o controlo da poluição. **Boletim de Biotecnologia**, São Paulo, v. 48, p. 16-25, 1994.

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

MIETTINEN, M. K.; BJORKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 187-192, Feb. 1999.

MING, L. C.; FIGUEIREDO, R. O.; MACHADO, S. R.; ANDRADE, R. M. C. Yield of essential oil and citral content in different parts of lemongrass leaves(*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf - Poaceae. **Acta Horticulturae**, Leiden, v. 426, n. 1, p. 555-559, 1996.

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

MORALES, M.; MÉNDEZ-ALVAREZ, S.; MARTIN-LÓPEZ, J. V.; MARRERO, C.; FREYTES, C. O. Biofilm: the microbial "bunker" for intravascular catheter-related infection. **Support Care Cancer**, v. 12, p. 701-707, 2004.

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.

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

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p. 229-237, Aug. 1993.

MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **Journal in Pathology & Bacteriology**, Edinburger, v. 29, p. 407-439, 1926.

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

NORWOOD, D. E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 576-582, Apr. 1999.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropilene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 178-185, Feb. 2008.

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

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

PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A.; LAMEIRA, O. A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 205 p.

PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 319-326, jul./set. 2004.

PIRIE, J. H. H. The genus *Listerella* Pirie. **Science**, New York, v. 91, n. 2364, p. 383, Apr. 1940.

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

POSER, G. L. von; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 63-76.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria. **Current Science**, Columbus, v. 85, n. 9, p. 1299-1307, Nov. 2003.

PRIGENT-COMBARET, C.; LEJEUNE, P. Monitoring gene expression in biofilms. **Methods Enzymology**, New York v. 310, p. 56-79, 1999.

PROSSER, L. T.; TAYLOR, B. D.; DIX, B. A.; CLEELAND, R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 31, p. 1502-1506, 1987.

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

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 197-209, Dec. 2000.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 1070-1075, Nov. 2008.

SANTOS, L. de A. G. dos; PINTO, P. S. de A.; MORAES, M. P.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUE, P. D.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S. Detecção de *Listeria monocytogenes* como subsídio a determinação de pontos críticos de controle no abate de suínos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 2, p. 131-135, maio/ago. 2005.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 403-434.

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

SEELIGER, H. P. R. New outlook on the epidemiology and epizootiology of listeriosis. **Acta microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 19, p. 273-286, 1972.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 155-159, Dec. 2000.

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

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

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, Mar. 2003.

SILVA, W. P da; LIMA, A. S. de; GANDRA, E. A.; ARAÚJO, M. R. de; MACEDO, M. R. P. de; DUVAÇ, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 911-916, maio/jun. 2004.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande no Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1986. 171 p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 467-495.

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

SMITH, G. A.; MARQUIS, H.; JONES, S.; JOHNSTON, N. C.; PORTNOY, D. A.; GOLDFINE, H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. **Infection and Immunity**, Washington, v. 63, p. 4231-4237, 1995.

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

SMOOT, L. M.; PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 10, p. 1293-1298, Oct. 1998.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review in Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 187-209, Jan. 2002.

STOODLEY, P.; WILSON, S.; HALL-STOODLEY, L.; BOYLE, J. D.; LAPPINSCOTT, H. M.; COSTERTON, J. W. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed species biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 12, p. 5608-5613, Dec. 2001.

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

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 69, p. 1911-1917, 1997.

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

TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes.* **Journal of Cell Biology**, New York, v. 109, p. 1597-1608, 1998.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 4, p. 709-725, Apr. 2002.

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

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

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

TRONGTOKIT, Y.; RONGSRIYAN, Y.; KOMALAMISRA, N.; APIWATHNASOM, L. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. **Phytotherapy Research**, Sussex, v. 19, n. 4, p. 303-309, Apr. 2005.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, Oct. 1999.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, July 2001.

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

VOGEL, B. F.; HUSS, H. H.; OJENIYI, B.; AHRENS, P.; GRAM, L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2586-2595, June 2001.

WALKER, J. T.; HANSON, K.; CALDWELL, D.; KEEVIL, C. W. Scanning confocal laser microscopy study of biofilm induced corrosion on copper plumbing tubes. **Biofouling**, Abingdon, v. 12, p. 333-344, 1998.

WANKE, M.; SKORUPINSKA-TUDEK, K.; SWIEZEWSKA, E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-

phosphate (DOXP/MEP) pathway. **Acta Biochimica Polonica**, Warson, v. 48, n. 3, p. 663-672, 2001.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 21, p. 319-346, 2005.

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

WIMPENNEY, J. W. T.; PETERS, A.; SCOURFIELD, M. A. The physiology and biochemistry of biofilm. In: CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. (Ed.). **Structure and function of biofilms**. Dahlem Workshop: J. Wiley and Sons, 1993. p. 111-127.

WINANS, S. C.; BASSLER, B. L. Mob psychology. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 184, n. 4, p. 873-883, Feb. 2002.

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

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2765-2770, 1998.

WONG, K. K. Y.; SIGNAL, F. A.; CAMPION, S. H.; MOTION, R. L. Citronella as an insect repellent in food packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 11, p. 4633-4636, June 2005.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; LOOSDRECHT, M. C. M. van. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, Lisboa, v. 76, p. 2-13, 2003.

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

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

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTILISTERIAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE *Cymbopogon*

1 RESUMO

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. Atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. In: _____. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes* a óleos essenciais**. 2009. cap. 2, p. 60-87. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Objetivou-se determinar o rendimento, a composição química e avaliar a atividade antilisterial dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, puros e em combinação. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada a partir de folhas frescas, empregando-se a técnica de hidrodestilação e utilizando-se aparelho de Clevenger modificado. A partir da massa obtida na extração e da umidade do material vegetal, os rendimentos foram calculados. A análise qualitativa foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa e a avaliação dos teores dos constituintes químicos por cromatografia em fase gasosa. O efeito bacteriostático de diferentes concentrações dos óleos essenciais, puros e em combinação, foi determinado pela técnica de difusão em ágar. As concentraçãos mínimas inibitórias (CMIs) foram utilizadas na determinação do tempo de ação bactericida. O rendimento, em base livre de umidade, foi de 1,39% (v/p) para o óleo essencial de *C. citratus* e de 2,27% (v/p) para o óleo essencial de *C. nardus*. Geranial e neral foram os constituintes majoritários do óleo essencial de *C. citratus*, enquanto, para *C. nardus*, foram citronelal, geraniol e citronelol. A maioria das concentrações utilizadas mostrou-se efetiva contra *L. monocytogenes* e observaram-se efeitos bactericidas nas CMIs. Óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, puros e em combinação, constituem novas alternativas de antibacterianos naturais a serem utilizados no controle de *L. monocytogenes*, na indústria de alimentos.

Palavras-chaves: *Listeria monocytogenes*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, óleos essenciais, atividade antibacteriana.

_____

*Comitê Orientador: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Orientadora) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. Antilisterial activity of essential oils of *Cymbopogon* species. In: _____. **Biofilm formation on stainless steel, biotransfer and sensitivity of *Listeria monocytogenes* to essential oils**. 2009. cap. 2, p. 60-87. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

The objective of this study was to determine the yield, chemical composition and to evaluate the antilisterial activity of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, pure and in combination. The obtaining of the essential oils was accomplished starting from fresh leaves employing the hydrodistillation technique and a modified Clevenger apparatus. Starting from the extracted mass obtained and the humidity of the vegetable material, the yield calculations were made. The qualitative analysis was done by gas phase chromatography coupled to mass spectrometry and the evaluation of the chemical constituent levels by gas phase chromatography. The bacteriostatic effect of different concentrations of the essential oils, pure and in combination, was determined by the agar diffusion technique. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were used in the determination of the time of bactericidal action. The yield based on dry matter was 1.39% (v/p) for the C. *citratus* essential oil and 2.27% (v/p) for the essential oil of *C. nardus*. Geranial and neral were the principal constituents of the *C. citratus* essential oil, while for *C. nardus* they were citronellal, geraniol and citronellol. Most of the concentrations used were shown to effective against *L. monocytogenes* and bactericidal effects were observed in MIC. Essential oils of C. *citratus* and *C. nardus*, pure and in combination constitute new alternatives of natural antibacterials to be used in the control of *L. monocytogenes* in the food industry

Key words: *Listeria monocytogenes*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, essential oils, antibacterial activity.

*Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Adviser) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

A flora brasileira é muito diversificada e rica (Giulietti et al., 2005). O gênero *Cymbopogon* possui mais de 100 espécies nos países tropicais, inclusive no Brasil, dentre as quais, aproximadamente 56 são aromáticas. A algumas delas deve-se dar atenção especial pelo seu grande uso na medicina popular e pelo teor de óleo essencial com as mais diferentes finalidades, como uso terapêutico, cosmético ou em perfumaria (Lorenzi & Matos, 2002). Dentro deste gênero encontram-se *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (capim-limão), originário da Índia, conhecido por fornecer óleo essencial rico em citral (Ming et al., 1996) e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (capim-citronela), originário do Ceilão, conhecido pelo poder repelente de seu óleo essencial rico em citronelal (Castro & Ramos, 2003).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides. Constituem elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência (Siani et al., 2000). Segundo Kelsey et al. (1984), as plantas sintetizam e emitem inúmeros compostos voláteis com a finalidade de defenderem-se ou de atrair seus polinizadores. Por isso, os óleos essenciais são considerados fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras.

Atualmente, crescente procura por plantas medicinais e aromáticas é observada em diversos países, devido à tendência dos consumidores em utilizarem, preferencialmente, produtos farmacêuticos ou alimentícios de origem natural (Martinazzo et al., 2007). Assim, tecnologias naturais de conservação

vêm se tornando cada vez mais importantes em indústrias de alimentos e os óleos essenciais constituem alternativas à obtenção de produtos microbiologicamente seguros (Ultee et al., 1999).

A listeriose é uma doença transmitida por alimentos causada por *Listeria monocytogenes*. Apesar da baixa incidência, esta enfermidade possui elevada taxa de mortalidade, quando comparada às demais toxinfecções alimentares (Rocourt et al., 2000). A ampla distribuição deste patógeno com habilidade de crescimento em temperaturas de refrigeração e tolerância a certos conservantes utilizados na indústria de alimentos tem resultado em extensivos esforços no desenvolvimento de processos de controle do seu crescimento.

O estudo da atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a *L. monocytogenes* tem sido realizado, principalmente, *in vitro* (Oussalah et al., 2007) e, recentemente, pela aplicação simultânea da bactéria e de óleos essenciais em produtos alimentícios (Cava et al., 2007; Solomakos et al., 2008). Uma alternativa, ainda mais recente, é a utilização de óleos essenciais como sanificantes no controle de biofilmes (Lebert et al., 2007; Chorianopoulos et al., 2008). A maioria dos trabalhos realizados tem alcançado excelentes resultados, demonstrando que o controle de *L. monocytogenes* por meio da utilização de óleos essenciais é uma linha de pesquisa relativamente nova e promissora.

A pesquisa com óleos essenciais que podem ser utilizados no controle de bactérias patogênicas na indústria de alimentos requer, como etapa inicial, o estudo da atividade antimicrobiana *in vitro*. Neste contexto, alguns fatores devem ser considerados e avaliados conjuntamente, como: (i) rendimento de óleo essencial da espécie vegetal utilizada, importante do ponto de vista econômico; (ii) composição química do óleo essencial, que irá influenciar diretamente na atividade biológica; (iii) concentração do óleo essencial a ser utilizada; (iv) efeito bactericida e ou bacteriostático do óleo essencial, bem como

o tempo necessário para que estes ocorram e (v) possível ação sinergística da combinação de óleos essenciais de espécies vegetais distintas.

Diante do exposto, face à importância do estudo de novas substâncias naturais capazes de controlar o crescimento e a presença de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos, objetivou-se, neste trabalho, determinar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, bem como avaliar a atividade antibacteriana dos mesmos, puros e em combinação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de execução do experimento

As análises referentes à determinação da umidade do material vegetal, extração, determinação do rendimento e avaliação dos teores dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, Brasil. A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS), em Aracaju, SE, Brasil. A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da UFLA.

4.2 Material vegetal

Foram utilizados 2.000 gramas de folhas frescas de *C. citratus* e *C. nardus*, coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA. A coleta foi realizada em janeiro de 2008, às 8 horas da manhã, em um dia com temperatura amena e sem precipitação pluviométrica. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil), a 21º14' S, longitude 45º00' W Gr. e 918 m de altitude. De acordo com Dantas et al. (2007), o clima, segundo a classificação climática de Köppen, é Cwa, temperado chuvoso (mesotérmico), com inverno seco e verão chuvoso, subtropical, com inverno seco e temperatura do mês mais quente maior que 22°C (22,8°C em fevereiro).

4.2.1 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade do material vegetal, 5 g de folhas frescas picadas foram imersas em 80 mL de ciclohexano (C_6H_{12}) em balão volumétrico com capacidade de 250 mL. Este foi acoplado a condensador com coletor volumetricamente graduado. O aquecimento do balão foi realizado por meio de manta aquecedora, controlando-se a temperatura a, aproximadamente, 100°C. Após 2,5 horas, o volume de água presente nas folhas foi quantificado. A umidade foi calculada a partir do teor de água contido em 100 g da amostra (Pimentel et al., 2006).

4.2.2 Óleos essenciais

4.2.2.1 Extração e determinação do rendimento

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, tendo sido utilizado aparelho de Clevenger modificado. Para tal, 75 g de folhas frescas de *C. citratus* e *C. nardus* foram picados e colocados, juntamente com água, em balão volumétrico com capacidade de 1.000 mL. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger modificado e a extração foi realizada pelo período de 2,5 horas, controlando-se a temperatura a, aproximadamente, 100°C. Posteriormente, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado a 321,8 x G, por 5 minutos. O óleo essencial foi retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e estocado, à temperatura de refrigeração, em frascos de vidro envoltos por papel alumínio (Guimarães et al., 2008).

Foi realizada a pesagem dos frascos utilizados para acondicionar os óleos essenciais antes e após a adição dos mesmos, objetivando-se obter a massa extraída em gramas. A partir da massa obtida na extração e da umidade do material vegetal, realizados, ambos, em três repetições, os rendimentos dos óleos essenciais extraídos foram calculados e expressos em base livre de umidade (%v/p BLU).

No restante do material vegetal (aproximadamente 1.775 gramas de cada espécie) o processo de extração dos óleos essenciais foi realizado como descrito acima. Entretanto, utilizou-se balão volumétrico com capacidade de 4 litros.

4.2.2.2 Identificação e quantificação dos constituintes químicos

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG/(EM). O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu CG-17A, equipado com detector seletivo de massa modelo QP5050A. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280ºC; programação da coluna com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, com aumento de 4°C/min, até 200°C; depois, 10°C/min até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C, por 10 minutos; gás carreador hélio ($1mL.min^{-1}$); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa de split 1:83 e volume injetado de 0,5 µL (1% de solução em diclorometano). Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto de 70 eV, velocidade de decomposição 1000, intervalo de decomposição de 0,50 e fragmentos de 40 Da e 550 Da decompostos. Foi injetada, nas mesmas condições da amostra, série de padrões de hidrocarbonetos (C_9H_{20} ..... $C_{26}H_{54}$). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e o índice Kovat`s (IK), calculado para cada constituinte, foi comparado com o tabelado, de acordo com Adams (2001).

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A, equipado com detector por ionização de chamas (FID), nas condições operacionais: coluna capilar DB5; a programação da coluna com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, com aumento de 4°C/min, até 200°C; depois, 10°C/min até 300°C, finalizando com

temperatura de 300°C por 10 minutos; temperatura do injetor de 220ºC; temperatura de detector de 240ºC; gás carreador nitrogênio (2,2 $mL.min^{-1}$); taxa de split 1:10 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa. A quantificação de cada constituinte foi obtida por meio de normalização de áreas (%).

4.3 Determinação da atividade antibacteriana

4.3.1 Microrganismo utilizado, padronização, estocagem e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado foi *L. monocytogenes* ATCC 19117, adquirido da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, SP, Brasil. Para a padronização do número de células, a cepa foi inicialmente inoculada em um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia), o qual foi incubado a 37°C. Em seguida, a partir do TSB, a curva de crescimento foi determinada pela realização periódica de leituras da absorbância da cultura a 600 nm e de diluições seriadas em solução salina [NaCl 0,9% (p/v)] com posterior plaqueamento em superfície para a determinação do Log $UFC.mL^{-1}$, utilizando-se como meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia).

Durante a realização de todo o experimento, a cepa foi estocada sob refrigeração em meio de cultura de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; pH 7,2±7,4). Para reativação e utilização da cepa, uma alíquota do meio de cultura de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37°C, por 24 horas, neste meio de cultura. Em seguida, a cultura foi estriada em TSA vertido em placas de Petri e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias

formadas na superfície do TSA, uma alçada foi retirada e transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de TSB, o qual foi incubado a 37°C, até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento, aproximadamente 9,17 Log UFC.mL^{-1} (OD_{600nm}=0,895).

4.3.2 Efeito bacteriostático

A metodologia empregada foi a de difusão em ágar, de acordo com Mendonça (2004), com modificações. Como meio de cultura, utilizou-se TSA adicionado de 0,5% de Tween 80. Para o preparo das cavidades de deposição dos óleos essenciais, uma camada inicial do meio de cultura foi depositada em placas de Petri, sobre as quais, após a solidificação, foram dispostas pérolas de vidro. Uma sobrecamada do meio de cultura contendo o inóculo na concentração de, aproximadamente, 8 Log UFC.mL^{-1} foi depositada sobre as pérolas de vidro dispostas na superfície da camada inicial. Após a solidificação da sobrecamada, as pérolas de vidro foram removidas com o auxílio de pinças estéreis, dando origem às cavidades. Em cada placa de Petri foram realizadas, no máximo, 5 cavidades. Em seguida, 10 µL das diferentes concentrações (0; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25,00; 50,00) expressas em % (v/v) dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* e da combinação dos dois óleos essenciais na proporção de 1:1, diluídas em etanol, foram transferidas para as cavidades. A concentração de 0% (v/v), constituída apenas de etanol, foi utilizada como controle positivo do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas, a 37ºC, por 24 horas e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados, retirando-se 3 mm referentes ao diâmetro da cavidade.

A presença de efeito bacteriostático foi caracterizada pelo comprometimento do crescimento bacteriano pela formação de halo de inibição. A menor concentração que apresentou efeito bacteriostático foi definida como concentração mínima inibitória (CMI).

4.3.3 Tempo de ação bactericida

O tempo de ação bactericida foi determinado utilizando-se a CMI. Para tal, 500 µL do inóculo na concentração de 9,17 Log UFC.mL^{-1} foram adicionados a tubos de ensaio contendo 3 mL de soluções à base de óleos essenciais e solução controle, perfazendo a concentração final de, aproximadamente, 8 Log UFC.mL^{-1}. Para a elaboração das soluções à base de óleos essenciais e solução controle, foram utilizadas as proporções e os diluentes sugeridos por Chorianopoulos et al. (2008), com modificação: a água destilada foi substituída por solução salina com 0,5% (v/v) de Tween 80. A solução salina foi utilizada no intuito de proporcionar concentração osmótica adequada à célula bacteriana, de modo que o efeito bactericida fosse atribuído somente aos óleos essenciais. O Tween 80 foi utilizado, assim como o etanol, como diluente dos óleos essenciais. Os óleos essenciais foram inicialmente diluídos em etanol e, em seguida, adicionados à solução salina 0,5% (v/v) de Tween 80. A composição das soluções à base de óleos essenciais e a solução controle estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 Composição das soluções à base de óleos essenciais e solução controle utilizadas na determinação do tempo de ação bactericida.

	Composição (%)		
Soluções	**Óleo essencial**	**Etanol**	**Solução salina com 0,5% (v/v) de Tween 80**
C. nardus	3,12	16,88	80,00
C. citratus	1,56	18,44	80,00
Combinação	1,56	18,44	80,00
Controle	0,00	20,00	80,00

Foram utilizados os seguintes tempos, em minutos: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60. Nesses períodos, alíquotas de 100 µL das soluções contendo o inóculo bacteriano foram retiradas e plaqueadas na superfície do TSA. Em seguida, as placas de Petri contendo TSA foram incubadas a 37ºC, por 24 horas. Foram realizadas três repetições em duplicata. O tempo de ação bactericida foi definido como o primeiro tempo, em minutos, que apresentou ausência total de crescimento bacteriano, representado pela formação de colônias, na superfície do TSA.

4.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3 x 9 (óleos essenciais e sua combinação x concentrações), com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, e análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 4.6 (Ferreira, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, encontram-se a percentagem de umidade das folhas frescas de *C. citratus* e *C. nardus* e o rendimento de seus óleos essenciais em base livre de umidade (BLU).

TABELA 2 Percentagem de umidade das folhas frescas de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* e rendimento de seus óleos essenciais, em base livre de umidade (BLU).

Material vegetal	Umidade %	Óleo essencial % (v/p)
C. citratus	71,66±2,88	1,39±0,54
C. nardus	67,33±1,15	2,27±0,70

Resultados expressos pela média ± o desvio padrão.

Resultados diferentes dos obtidos, no que diz respeito ao rendimento de óleo essencial de *C. citratus* e de *C. nardus*, foram encontrados em vários trabalhos consultados. Pereira et al. (2008), estudando o rendimento de óleo essencial de *C. citratus*, obtiveram valor de 2,16%, em BLU. No que diz respeito ao óleo essencial de *C. nardus*, Marco et al. (2007), estudando diferentes espaçamentos, alturas e épocas de cortes, encontraram resultados variando de 3,52% a 4,18% de óleo essencial na matéria seca.

Segundo Burt (2004), variações no rendimento de óleo essencial entre plantas pertencentes à mesma espécie podem ser atribuídas, principalmente, a diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região e umidade relativa do ar.

Em relação à composição química, observam-se, pelos dados das Tabelas 3 e 4, que os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* apresentaram

monoterpenos como constituintes majoritários. No óleo essencial de *C. citratus*, o componente majoritário encontrado foi o geranial (42,91%), seguido do neral (30,90%). Estes dois compostos são estereoisômeros e sua mistura constitui o citral. Assim, o citral é uma mistura isomérica de geranial [(2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral A ou isômero E] e neral [(2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal; citral B ou isômero Z] (El Fattah et al., 1992). No óleo essencial de *C. nardus*, os constituintes majoritários encontrados foram citronelal (34,60%), seguido de geraniol (23,17%) e citronelol (12,09%). A maior concentração de citronelal ocorreu, provavelmente, devido à oxidação do citronelol, um álcool secundário, em citronelal. Na Figura 1 observam-se as estruturas químicas dos monoterpenos encontrados como constituintes majoritários nos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*.

TABELA 3 Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* identificados por CG/(EM) e seus teores.

Constituintes	**IK calculado**	**Teor (%)**
Mirceno	991	1,3687
(Z)-β-ocimeno	1040	0,1402
(E)-β-ocimeno	1051	0,2024
Linalol	1199	1,5175
Neral	1244	30,9096
Geraniol	1254	1,1770
Geranial	1273	42,9192
2-undecanona	1292	4,1296
Outros	-	17,6358
Total		**100,00**

TABELA 4 Constituintes químicos do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* identificados por CG/(EM) e seus teores.

Constituintes	IK calculado	Teor (%)
Limoneno	1028	1,0874
Linalol	1100	0,5068
Neo-isopulegol	1147	0,2541
Citronelal	1156	34,6098
Citronelol	1229	12,0956
Geraniol	1254	23,1753
Geranial	1268	0,5745
Acetato de citronelil	1350	2,0654
β-elemeno	1389	3,2803
Germacreno D	1481	1,7834
α-muuroleno	1497	1,1096
γ-cadineno	1512	2,9393
δ-cadineno	1517	2,6304
Outros	-	13,8881
Total		**100,00**

Em óleos essenciais, os constituintes e suas concentrações relativas não dependem somente da espécie da planta. Entre os vários fatores que influenciam a composição química, os mais importantes são a origem da planta, a parte da planta utilizada, o estágio de desenvolvimento da planta, as condições climáticas e de crescimento, como temperatura, solo e fertilizantes e as condições de destilação e estocagem (Oladimeji et al., 2001). Tais fatores podem explicar as diferenças observadas entre as composições químicas dos óleos essenciais utilizados neste estudo e as composições químicas dos óleos essenciais de alguns trabalhos já realizados. Entretanto, observa-se que os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais utilizados neste estudo assemelham-se aos encontrados nos trabalhos consultados. Guimarães et al. (2008), analisando a composição química do óleo essencial de *C. citratus*, encontraram, como constituintes, geranial (37,42%), neral (31,89%), mirceno (23,77%), linalol

(0,82%), (Z)-β-ocimeno (0,50%), (E)-β-ocimeno (0,28%) e 2-undecanona (0,27%). Já Castro et al. (2007) obtiveram como principais constituintes, para o óleo essencial de *C. nardus*, citronelal (36,67%), geraniol (25,05%), citronelol (11,40%) e elemol (6,99%).

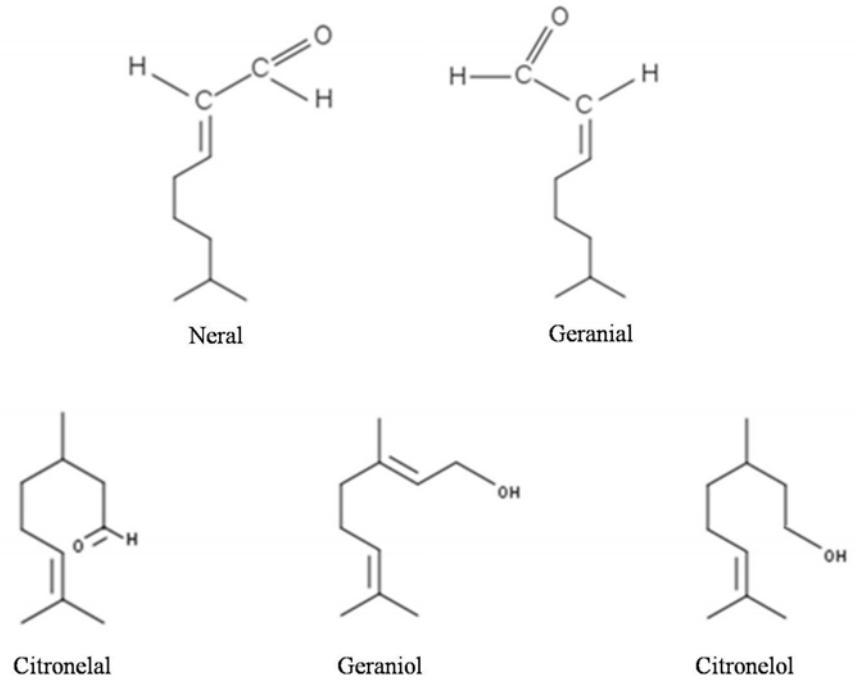


FIGURA 1 Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus*.

O grau de inibição do crescimento microbiano pode ser estimado pela metodologia de difusão em ágar. A efetividade de determinado óleo essencial é representada pelo tamanho da zona de inibição formada na superfície do ágar,

em volta do disco ou da cavidade (Kalemba & Kunicka, 2003). Todavia, apesar de a metodologia ser amplamente utilizada (Mondello et al., 2003), ela é criticada por alguns autores, pois acredita-se que a natureza hidrofóbica dos óleos essenciais impede a difusão uniforme dessas substâncias através do meio de cultura (Lambert et al., 2001). Entretanto, Inouye et al. (2006) demonstraram que a atividade de vapor dos óleos essenciais contribui na formação do halo de inibição, o que sugere que a difusão em ágar é método válido na determinação da atividade antimicrobiana, no qual a baixa capacidade de difusão dos óleos essenciais é compensada pela elevada volatilidade dos mesmos.

A capacidade dos óleos essenciais de inibir o crescimento bacteriano permite que os mesmos sejam utilizados como antimicrobianos naturais na indústria de alimentos. Neste contexto, é necessário verificar em qual concentração os mesmos devem ser aplicados. Para isso, devem ser realizados testes *in vitro* que determinem a menor concentração que apresente efeito bacteriostático ou inibitório. Dessa forma, a concentração mínima inibitória (CMI) é citada como medida do desempenho antibacteriano dos óleos essenciais (Burt, 2004). As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) encontradas foram de 1,56% (v/v), para o óleo essencial de *C. citratus* e para a combinação dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, e 3,12% (v/v), para o óleo essencial de *C. nardus*.

Oussalah et al. (2007) também observaram superioridade na atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. citratus* frente a *L. monocytogenes*, quando comparado ao de *C. nardus*. A CMI encontrada para o óleo essencial de *C. citratus* foi 0,4% (v/v), enquanto, para o óleo essencial de *C. nardus*, foi 0,8% (v/v). Os menores valores encontrados por estes autores, em comparação aos obtidos neste estudo, podem ser atribuídos às menores concentrações de inóculo bacteriano utilizadas pelos mesmos, cerca de 4 e 5 Log UFC.mL^{-1}.

Apesar de os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* e sua combinação apresentarem efeito bacteriostático frente a *L. monocytogenes* na maioria das concentrações, observou-se que a efetividade dos mesmos depende da concentração em que são utilizados. Na análise de variância realizada a partir dos resultados obtidos pelo método de difusão em ágar, observou-se interação significativa (P<0,01) entre os óleos essenciais e as diferentes concentrações utilizadas. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento de óleos essenciais dentro de cada nível de concentração, conforme exposto na Tabela 5.

TABELA 5 Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus* e sua combinação, frente a *Listeria monocytogenes*.

Concentrações	**Óleos essenciais**		
% (v/v)	***C. nardus***	***C. citratus***	**Combinação**
0,00	0,00±0,00[a]	0,00±0,00[a]	0,00±0,00[a]
0,39	0,00±0,00[a]	0,00±0,00[a]	0,00±0,00[a]
0,78	0,00±0,00[a]	0,00±0,00[a]	0,00±0,00[a]
1,56	0,00±0,00[a]	1,58±0,14[b]	1,32±0,32[b]
3,12	1,30±0,20[a]	2,22±0,26[a]	1,83±0,38[a]
6,25	1,92±0,33[a]	2,83±0,38[a]	2,50±0,50[a]
12,50	2,60±0,36[a]	2,75±0,75[a]	3,00±0,25[a]
25,00	3,05±0,26[a]	3,38±1,79[a]	4,38±0,13[b]
50,00	3,83±1,13[a]	6,35±0,41[b]	7,05±0,69[b]

Resultados expressos pela média dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm) ± o desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (diferença mínima significativa = 0,98).

Nas concentrações de 12,50%, 6,25%, 3,12%, 0,39%, 0,78% e 0,00% (v/v), os efeitos bacteriostáticos dos óleos essenciais e sua combinação não diferiram entre si (P>0,05). Já nas concentrações de 50,00% e 1,56% (v/v), os efeitos bacteriostáticos do óleo essencial de *C. citratus* e da combinação dos

óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* não diferiram entre si (P>0,05), entretanto, foram superiores (P<0,05) ao do óleo essencial de *C. nardus* (Tabela 5).

Diferenças na atividade antibacteriana existentes entre óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, como a observada entre os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, são relacionadas à concentração e à natureza de seus constituintes químicos (Chang et al., 2001). Segundo Kalemba & Kunicka (2003), aldeídos possuem maior atividade antimicrobiana quando comparados a alcoóis. No que diz respeito aos óleos essenciais utilizados, os constituintes majoritários encontrados foram monoterpenos classificados como aldeído (neral e geranial que isoméricamente formam o citral), no caso de *C. citratus* e aldeído (citronelal) e álcool (geraniol e citronelol), no caso do *C. nardus* (Tabelas 3 e 4). Dessa forma, a superioridade do efeito bacteriostático apresentado pelo óleo essencial de *C. citratus* nas concentrações de 50,00% e 1,56% (v/v), quando comparado ao óleo essencial de *C. nardus*, pode ser explicada pelo elevado teor de citral (73,82%) presente em sua composição (Tabela 3). A maior proporção de aldeídos também pode ter sido responsável pela superioridade do efeito bacteriostático da combinação dos óleos essenciais nestas mesmas concentrações, quando comparado ao do óleo essencial de *C. nardus* utilizado puro.

O mecanismo de ação dos monoterpenos envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão, preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas de membrana (Sikkema et al., 1995). O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá conferir a esta uma característica de permeabilidade. Em bactérias, a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de

ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de íons, como íons potássio e fosfato (Bakkali et al., 2008). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (Sikkema et al., 1994).

Os diâmetros dos halos de inibição formados pela combinação dos óleos essenciais nas concentrações de 50,00%, 25,00% e 12,50% (v/v) apresentaram-se superiores aos diâmetros dos halos de inibição dos óleos essenciais puros nas mesmas concentrações. Porém, o efeito sinergístico pode ser observado somente na concentração de 25,00% (v/v), na qual o efeito bacteriostático da combinação dos óleos essenciais foi significativamente superior ($P<0,05$) ao dos mesmos utilizados puros (Tabela 5).

A combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas pode representar alternativa para potencializar a ação dos mesmos (Pereira et al., 2008). O termo sinergismo é definido como o aumento da atividade de compostos ou fatores quando aplicados em conjunto, comparada à atividade dos mesmos, quando utilizados individualmente (Williamson, 2001; Ceylan & Fung, 2004). Tratando-se de óleos essenciais, vários estudos já realizados *in vitro*, utilizando a combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, alcançaram resultados promissores (Delaquis et al., 2002; Fu et al., 2007; Al-Bayati, 2008; Gutierrez et al., 2008), o que demonstra que esta é uma alternativa viável a ser utilizada no controle microbiológico de alimentos.

O método de difusão em ágar comprovou o potencial bacteriostático da maioria das concentrações dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, puros e em combinação. Todavia, para que estes sejam totalmente efetivos na eliminação de *L. monocytogenes*, a comprovação do efeito bactericida é necessária. Nesse intuito, as CMIs encontradas foram utilizadas na determinação do tempo de ação bactericida. Todas as soluções à base de óleos essenciais

utilizadas (Tabela 1) apresentaram atividade bactericida. Entretanto, os tempos de ação bactericida obtidos diferiram entre si, sendo de 0 minuto para a solução à base de óleo essencial de *C. nardus*, 5 minutos para a solução à base de óleo essencial de *C. citratus* e 15 minutos para a solução constituída da combinação dos óleos essenciais. Na solução controle, o inóculo bacteriano manteve-se viável durante todo o período analisado (60 minutos).

Este resultado indica que os tempos de ação bactericida obtidos podem estar diretamente relacionados às quantidades de óleos essenciais utilizadas nas soluções, uma vez que quanto maior a quantidade de óleo essencial, menor o tempo de ação bactericida encontrado. Segundo Holley & Patel (2005), mudanças na concentração dos óleos essenciais podem alterar a natureza da ação antibacteriana e este efeito pode estar relacionado à influência da concentração em relação à capacidade de solubilidade na membrana citoplasmática. Dessa forma, quanto maior a concentração de óleo essencial utilizada na solução, maior será a capacidade do mesmo de se deslocar em direção à membrana citoplasmática bacteriana, afetando assim seu funcionamento.

Óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* constituem novas alternativas de antibacterianos naturais a serem utilizados no controle de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos. O efeito sinergístico da combinação dos mesmos não deve ser descartado e representa uma maneira de potencializar a atividade antibacteriana individual desses compostos.

6 CONCLUSÕES

O rendimento encontrado, em BLU, foi de 1,39% (v/p), para o óleo essencial de *C. citratus* e de 2,27% (v/p), para o óleo essencial de *C. nardus*.

Os compostos majoritários encontrados foram neral e geranial, para o óleo essencial de *C. citratus* e citronelal, geraniol e citronelol, para o óleo essencial de *C. nardus*.

No que diz respeito ao efeito bacteriostático, os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* e sua combinação mostraram-se efetivos contra *L. monocytogenes*, na maioria das concentrações utilizadas. Ocorreu sinergismo na concentração de 25,00% (v/v) e houve efeito bactericida quando estes foram utilizados na CMI.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2001. 456 p.

AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 116, n. 3, p. 403-406, Mar. 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

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.

CASTRO, H. G.; BARBOSA, L. C. A.; LEAL, T. C. A. B.; SOUZA, C. M.; NAZARENO, A. C. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 55-61, 2007.

CASTRO, L. O. de; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais**: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver. Porto Alegre: FEPAGRO, 2003. 23 p.

CAVA, R.; NOWAK, E.; TABOADA, A.; MARIN-INIESTA, F. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 12, p. 2757-2763, Dec. 2007.

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

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

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. M.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, June 2008.

DANTAS, A. A. A. do; CARVALHO, L. G. D.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 101-109, Mar. 2002.

EL FATTAH, M. A.; EL ZAHWEY, A. M.; HARIDY, I. M.; EL DEEB, S. A. Effect of drying on the physicochemical properties and chemposition of lemongrass oil. **Menofiya Journal Agriculture Research**, v. 17, n. 3, p. 1211-1230, 1992.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**.- Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos Versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.

FU, Y. J.; ZU, Y. G.; CHEN, L. Y.; SHI, X. G.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, Sussex, v. 21, n. 10, p. 989-994, June 2007.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P. de; WANDERLEY, M. das G. L.; BERG, C. van den. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 52-61, jul. 2005.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. de; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. de. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients.

International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, May 2008.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 4, p. 273-292, Aug. 2005.

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

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 10, n. 10, p. 813-829, May 2003.

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G. W.; RODRIGUEZ, E. The chemistry of. biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P. L.; METHA, I. (Ed.). **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum, 1984. p. 187-241.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544 p.

MARCO, C. A.; INNECCO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N. S. S.; NAGAO, E. O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 429-432, set. 2007.

MARTINAZZO, A. P.; CORRÊA, P. C.; RESENDE, O.; MELO, E. de C. Análise e descrição matemática da cinética de secagem de folhas de capim-limão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, n. 3, p. 301-306, jun. 2007.

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

MING, L. C.; FIGUEIREDO, R. O.; MACHADO, S. R.; ANDRADE, R. M. C. Yield of essential oil and citral content in different parts of lemongrass leaves(*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf - Poaceae. **Acta Horticulturae**, Leiden, v. 426, n. 1, p. 555-559, 1996.

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

OLADIMEJI, F. A.; ORAFIDIYA, O. O.; OKEKE, I. N.; DAGNE, E. Effect of autoxidation on the composition and antimicrobial activity of essential oil of *Lippia multiflora*. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, Stuttgart, v. 11, n. 2, p. 64-67, 2001.

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

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

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

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 3, p. 197-209, Dec. 2000.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 16, p. 38-43, 2000.

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

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

SOLOMAKOSA, N.; GOVARISA, A.; KOIDISB, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 120-127, Feb. 2008.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, Oct. 1999.

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

CAPÍTULO 3

FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Listeria monocytogenes* SOBRE SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL E POTENCIAL DE BIOTRANSFERÊNCIA

1 RESUMO

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável e potencial de biotransferência. In: _____. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes* a óleos essenciais**. 2009. cap. 3, p. 88-116. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Com o objetivo de estudar a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) e o potencial de biotransferência durante este processo, foi proposto um modelo experimental. Nesse modelo, a formação do biofilme foi realizada sobre a superfície de cupons de aço inoxidável, dispostos em um suporte de aço inoxidável com 4 divisões, cada qual dando apoio a 21 cupons. Como substrato de crescimento bacteriano foi utilizado caldo triptona de soja (TSB), com incubação a 37°C e agitação de 50 rpm. O número de células aderidas foi determinado após 3, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de formação do biofilme e o potencial de biotransferência a partir das 96 horas. Cupons de aço inoxidável foram submetidos à microscopia eletrônica de varredura (MEV) após 3, 144 e 240 horas. Pelo número de células aderidas e pela MEV observou-se que *L. monocytogenes* aderiu rapidamente à superfície de aço inoxidável, formando biofilme maduro após 240 horas. O potencial de biotransferência da bactéria ao substrato ocorreu em todas as etapas analisadas. A rápida capacidade de adesão a superficie, somada ao potencial de biotransferência durante todas as etapas de formação do biofilme, fazem de *L. monocytogenes* um risco potencial para a indústria de alimentos. O modelo experimental desenvolvido e a metodologia utilizada foram eficientes no estudo da formação de biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável.

Palavras-chaves: adesão bacteriana, células planctônicas, contaminação cruzada.

_____

*Comitê Orientador: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Orientadora) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. In: _____. **Biofilm formation on stainless steel, biotransfer and sensitivity of *Listeria monocytogenes* to essential oils**. 2009. cap. 3, p. 88-116. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

An experimental model was proposed to study biofilm formation by *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 on AISI 304 (#4) stainless steel surface and biotransfer potential during this process. In this model, biofilm formation was conducted on the surface of stainless steel coupons, set on a stainless steel base with 4 divisions, each supporting 21 coupons. Trypic Soy Broth (TSB) was used as a bacterium growth substrate, with incubation at 37 °C and stirring of 50 rpm. The number of adhered cells was determined after 3, 48, 96, 144, 192 and 240 hours of biofilm formation and biotransfer potential after 96 hours. Stainless steel coupons were submitted to Scanning Electron Microscopy (SEM) after 3, 144 and 240 hours. Based on the number of adhered cells and SEM, it was observed that *L. monocytogenes* adhered rapidly to stainless steel surface, with mature biofilm being formed after 240 hours. The potential of bacterium biotransfer to substrate occurred in all the stages analyzed. The rapid capacity of adherence to surface, combined with biotransfer potential throughout the biofilm formation stages make *L. monocytogenes* a potential risk to the food industry. Both the experimental model developed and the methodologies used were efficient in the study of biofilm formation by *L. monocytogenes* on stainless steel surface.

Key words: bacterial adhesion, planktonic cells, cross contamination.

*Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Adviser) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

O termo biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana séssil, caracterizada pela adesão de microrganismos a superfícies bióticas ou abióticas, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares (Costerton et al., 1999; Nikolaev & Plakunov, 2007). Em indústrias processadoras de alimentos, superfícies de equipamentos e utensílios de aço inoxidável são reconhecidas como os principais locais de adesão microbiana e formação de biofilmes (Wong, 1998; Chmielewski & Frank, 2003).

Células microbianas aderidas a superfícies podem vir a contaminar produtos alimentícios que passam pelo local durante o processamento. Esta habilidade de transferência, por contato, do microrganismo ao alimento é denominada potêncial de biotransfrência. Microrganismos viáveis aderidos a superfícies apresentarão potencial de biotransferência mesmo que o número de células presente seja baixo ou variado dentro de determinada área (Hood & Zottola, 1995; Midelet & Carpentier, 2004).

Inúmeros microrganismos são capazes de participar do processo de adesão e formação de biofilmes. Na indústria de alimentos, estes podem ser divididos em deteriorantes e patogênicos. Dentre os microrganismos patogênicos, destaca-se *Listeria monocytogenes*. Patógeno alimentar emergente e de distribuição ubíqua na natureza, esta bactéria sobrevive a condições ambientais adversas, se desenvolve em diferentes substratos e é capaz de colonizar superfícies bióticas e abióticas (Torres et al., 2005; Pan et al., 2006; Gandhi & Chikindas, 2007). Estudos têm demonstrado a capacidade de persistência de *L. monocytogenes* no ambiente durante anos (Senczek et al., 2000; Lunden et al., 2002). Pesquisas realizadas sobre a presença de *L. monocytogenes* em superfícies de equipamentos e utensílios que entram em

contato com alimentos relatam sua ocorrência em indústrias processadoras de carne e produtos cárneos (Chasseignaux et al., 2002; Barros et al., 2004; Cruz et al., 2008; López et al., 2008), leite e derivados lácteos (Chambel et al., 2007). Segundo Chae et al. (2006), a ocorrência de surtos, bem como de casos esporádicos causados por esta bactéria, pode ser atribuída ao aumento da habilidade de sobrevivência em ambientes de processamento de alimentos por meio da formação de biofilmes.

A listeriose é uma doença de origem alimentar atípica devido à alta gravidade, à natureza não entérica e ao longo período de incubação (Loguercio et al., 2001). Dessa forma, o elevado risco de contaminação de alimentos a partir de células sésseis de *L. monocytogenes*, com consequente veiculação de infecções de origem alimentar, faz com que seja necessário o desenvolvimento de estratégias de controle, que objetivem retardar, reduzir ou mesmo eliminar o acúmulo desta bactéria em superfícies industriais.

A associação de *L. monocytogenes* a superfícies tem sido analisada, principalmente em estudos conduzidos em laboratório. Entretanto, tais estudos ainda necessitam de padronização, uma vez que são difíceis de serem realizados *in situ*, em ambientes de processamento de alimentos (Møretrø & Langsrud, 2004). A dificuldade na investigação de biofilmes microbianos na natureza e a existência de condições experimentais precariamente definidas em laboratório levaram ao desenvolvimento de diferentes modelos experimentais de formação de biofilmes *in vitro* (Palmer Junior, 1999). Estes sistemas permitem o estudo de biofilmes sob condições definidas e controladas e são necessários à execução de experimentos reprodutíveis (Heydorn et al., 2000).

O presente trabalho propõe a utilização de um modelo experimental baseado em sistema proposto por Gram et al. (2007) e, por este, estuda a formação de biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19117 sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), utilizando contagem padrão em placas e

microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o potencial de biotransferência durante este processo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de execução do experimento

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos (DCA) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME).

4.2 Microrganismo utilizado, padronização, estocagem e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado foi *L. monocytogenes* ATCC 19117 adquirida da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, SP, Brasil. Para a padronização do número de células, a cepa foi inicialmente inoculada em um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia), o qual foi incubado a 37°C. Em seguida, a partir do TSB, a curva de crescimento foi determinada pela realização periódica de leituras da absorbância da cultura a 600 nm e de diluições seriadas em solução salina [NaCl 0,9% (p/v)] com posterior plaqueamento em superfície para a determinação do Log UFC.mL^{-1}, utilizando-se como meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia).

Durante a realização de todo o experimento, a cepa foi estocada sob refrigeração em meio de cultura de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; pH 7,2±7,4). Para reativação e utilização da cepa, uma alíquota do meio de cultura de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37°C, por 24 horas, neste meio de cultura. Em seguida, a cultura foi estriada em

TSA vertido em placas de Petri e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, uma alçada foi retirada e transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de TSB, o qual foi incubado a 37°C até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento, aproximadamente 9,17 Log UFC.mL^{-1} (OD_{600nm}=0,895).

4.3 Modelo experimental de formação do biofilme

O modelo experimental de formação do biofilme por *L. monocytogenes* (Figura 1A) foi elaborado segundo sistema proposto por Gram et al. (2007) e consistiu nos seguintes itens: suporte de aço inoxidável AISI 304 (#4), composto por 4 divisões, cada qual dando lugar ao apoio de 21 cupons de aço inoxidável AISI 304 (#4) (1 x 8 x 18 mm), dispostos verticalmente (Figura 1B); béquer de 1000 mL; barra magnética e agitador magnético, utilizado com a finalidade de permitir a livre circulação do substrato dentro do béquer. O béquer foi lacrado com auxílio de placa de Petri e filme plástico. O aço inoxidável AISI 304 (#4) foi o escolhido por ser o mais utilizado na indústria de alimentos.

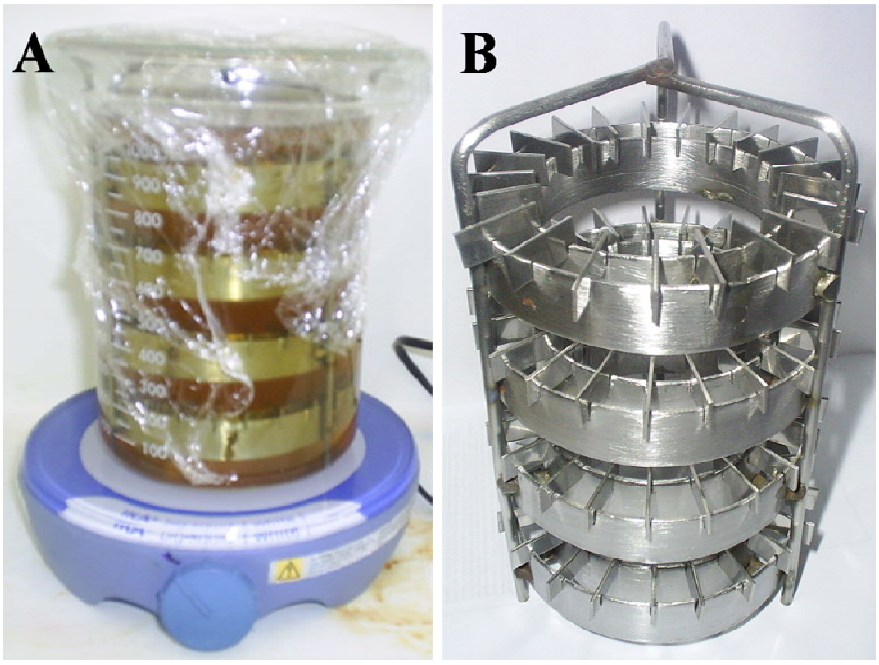


FIGURA 1 (A) Modelo experimental de formação do biofilme, utilizando como substrato de crescimento bacteriano meio de cultura caldo triptona de soja (TSB). (B) Suporte e cupons de aço inoxidável AISI 304 (#4) pertencentes ao modelo experimental de formação do biofilme.

4.4 Preparo dos cupons e suporte de aço inoxidável

Para proceder à etapa de adesão das células bacterianas, tanto os cupons quanto o suporte de aço inoxidável foram previamente higienizados e esterilizados. Para tanto, foram limpos com acetona 100%, lavados por imersão em detergente alcalino [NaOH 1% (p/v), pH 13,2] por 1 hora, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, foram novamente lavados com água destilada esterilizada, secos

por 2 horas, a 60ºC e autoclavados, a 121ºC, por 15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

4.5 Adesão das células bacterianas a superfície dos cupons de aço inoxidável

Inicialmente, 1000 mL de TSB previamente esterilizado e 70 mL de TSB contendo a cultura bacteriana foram adicionados ao béquer contendo a barra magnética, perfazendo a concentração final de aproximadamente 8 Log $UFC.mL^{-1}$. Em seguida, o suporte de aço inoxidável contendo os cupons foi disposto no interior do béquer, o qual foi lacrado e incubado, a 37ºC, sob agitação de 50 rpm. A cada 48 horas, os cupons foram retirados do suporte e mergulhados 3 vezes em solução salina, objetivando-se a remoção das células planctônicas. A seguir, os cupons foram dispostos em novo suporte esterilizado, o qual foi imerso em 1.000 mL de TSB em um béquer contendo barra magnética. Tanto o TSB como o béquer e a barra magnética estavam esterilizados. Na sequência, o sistema foi lacrado e incubado, a 37ºC, sob agitação de 50 rpm. Esse procedimento foi repetido a cada 48 horas, completando 240 horas de incubação, visando à formação do biofilme maduro.

A substituição do suporte de aço inoxidável, do béquer e do meio de cultura (TSB) a cada 48 horas, bem como a remoção das células planctônicas, objetivou simular a permanência de células aderidas à superfície de aço inoxidável após o procedimento de higienização, quando este é realizado de maneira incorreta na indústria de alimentos.

4.6 Enumeração das células bacterianas aderidas

O número de células bacterianas aderidas aos cupons de aço inoxidável foi determinado após 3, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de cultivo. Inicialmente, os cupons foram mergulhados 3 vezes em solução salina, removendo-se assim as células planctônicas. Em seguida, as células aderidas foram retiradas utilizando-

se *swabs* padronizados (15 mm x 25 mm) previamente esterilizados. Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina e agitados em vórtex por um minuto. Diluições seriadas até 10^{-6} foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo TSA, utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície. Após este procedimento, as placas de Petri foram incubadas, a 37ºC, por 24 horas. Para cada período de mensuração, utilizaram-se dois cupons coletados aleatoriamente, constituindo-se a replicata. Foram realizadas três repetições do experimento e, em cada uma delas, os resultados foram expressos pela média dos cupons em Log UFC.cm^{-2}.

4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Cupons de aço inoxidável foram submetidos à MEV após 3, 144 e 240 horas de formação do biofilme. Para tanto, foram, inicialmente, imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado: glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 e $CaCl_2$ 0,001M) por um período mínimo de 24 horas. Após este período, foram lavados com tampão cacodilato de sódio por três vezes de 10 minutos. Após a lavagem, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (1% em água destilada), durante 1 hora, à temperatura ambiente em capela de exaustão. Em seguida, foram lavados três vezes em água destilada e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). Posteriormente, foram conduzidos ao aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) para completar a secagem, montados em *stubs* e cobertos com ouro no metalizador (Bal-tec CPD 050) (Bossola & Russell, 1998). Ao final desse procedimento, foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo), obtendo-se as eletromicrografias.

4.8 Avaliação do potencial de biotransferência

Alíquotas de 1 mL do TSB foram retiradas do béquer às 0, 3, 48, 96, 144, 192 e 240 horas de incubação dos cupons de aço inoxidável. A partir das 48 horas, essas alíquotas foram retiradas imediatamente antes da troca do meio de cultura (TSB). Diluições seriadas até 10^{-10} foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo TSA, utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície. As placas de Petri foram incubadas, a 37ºC, por 24 horas. A avaliação do desprendimento de células do biofilme para o meio de cultura foi realizada pela contagem obtida a partir das 96 horas, visto que, até as 48 horas, o número de células existente era referente ao inóculo inicial. Foram realizadas três repetições do experimento e o resultado foi expresso em Log $UFC.mL^{-1}$.

4.9 Determinação da capacidade de adesão inicial

A capacidade de adesão inicial foi determinada, em cada repetição, pela divisão do Log $UFC.cm^{-2}$ do número de células aderidas após 3 horas pelo número de células do inóculo inicial em Log $UFC.mL^{-1}$. O resultado foi multiplicado por 100 (Chae & Schraft, 2000; Chae et al., 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela MEV, observou-se o desenvolvimento do biofilme de *L. monocytogenes* formado sobre superfície de aço inoxidável. Nas Figuras 2, 3 e 4 (A e B) pode-se observar a adesão das células de *L. monocytogenes* em aço inoxidável após 3, 144 e 240 horas de contato, respectivamente. *L. monocytogenes* aderiu à superfície de aço inoxidável, apresentando contagem de 4,89 Log UFC.cm^{-2} após 3 horas de contato (Tabela 1). Assim como descrito pelo método de contagem em placas, pela MEV verificou-se rápida adesão de *L. monocytogenes* à superfície. Após 3 horas de contato, a distribuição das células aderidas à superfície ocorreu de maneira irregular. Nesta etapa, duas diferentes situações foram observadas. Em algumas áreas várias células encontravam-se aderidas à superfície. Em sua maioria, estas células encontravam-se em processo de fissão binária, o que indica a possível formação posterior de microcolônias no local (Figura 2A). Entretanto, em alguns locais, a adesão bacteriana observada não foi tão evidente (Figura 2B).

A capacidade de adesão bacteriana ocorre em função do inóculo inicial (tempo 0) e é um parâmetro que avalia a habilidade de fixação de células livres provenientes do meio líquido a superfícies sólidas, o que corresponde à primeira etapa de desenvolvimento do biofilme. A capacidade de adesão inicial, medida às 3 horas, foi de 58,75±0,9% e correspondeu a um inóculo de 8,26±0,18 Log UFC.mL^{-1} (OD_{600nm} = 0,873±0,04).

A capacidade de adesão inicial de *L. monocytogenes* tem sido estudada principalmente em vidro. A comparação dos resultados disponíveis na literatura com os obtidos neste estudo indica que a capacidade de adesão inicial dessa bactéria em vidro é menor que a em aço inoxidável. Chae et al. (2006), utilizaram diferentes cepas de *L. monocytogenes* e inóculo inicial de 8 Log

UFC.mL^{-1} e obtiveram, após 3 horas de contato das culturas bacterianas com a superfície de vidro, valores de 2,52 a 4,54 Log UFC.cm^{-2}, sendo a capacidade de adesão inicial encontrada variando de 29,09% a 51,78%. Segundo os autores, cepas epidêmicas (envolvidas em surtos de infecções alimentares) apresentaram maior capacidade de adesão inicial. Resultados semelhantes foram obtidos por Chae & Schraft (2000) que, utilizando inóculo inicial de 7 a 8 Log UFC.mL^{-1}, obtiveram, após 3 horas de contato das culturas bacterianas com a superfície de vidro, 2,23 a 4,44 Log UFC.cm^{-2} de bactérias aderidas e valores de capacidade de adesão inicial entre 28,9% a 49,87%. Cinco cepas foram utilizadas durante a formação do biofilme por 96 horas de cultivo. As contagens obtidas neste período variaram de 4 a 5 Log UFC.cm^{-2}, o que indica que, apesar dos diferentes valores de capacidade de adesão, *L. monocytogenes* tem comportamento de formação de biofilme semelhante para as duas superfícies, vidro e aço inoxidável.

TABELA 1 Número de células planctônicas (Log UFC.mL^{-1}) e sésseis (Log UFC.cm^{-2}) de *Listeria monocytogenes*, quantificadas durante a formação do biofilme sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), com incubação a 37°C e utilizando meio de cultura triptona de soja (TSB) como substrato.

Tempo (horas)	**TSB (Log UFC.mL^{-1})**	**Aço inoxidável (Log UFC.cm^{-2})**
3	8,97 ± 0,16	4,89±0,03
48	8,85 ± 0,65	4,08±0,67
96	9,95 ± 0,62	4,64±0,57
144	9,55 ± 0,17	4,63±0,60
192	9,74 ± 0,11	4,52±0,47
240	9,36 ± 0,03	5,64±1,07

Resultados referentes à média ± o desvio padrão.

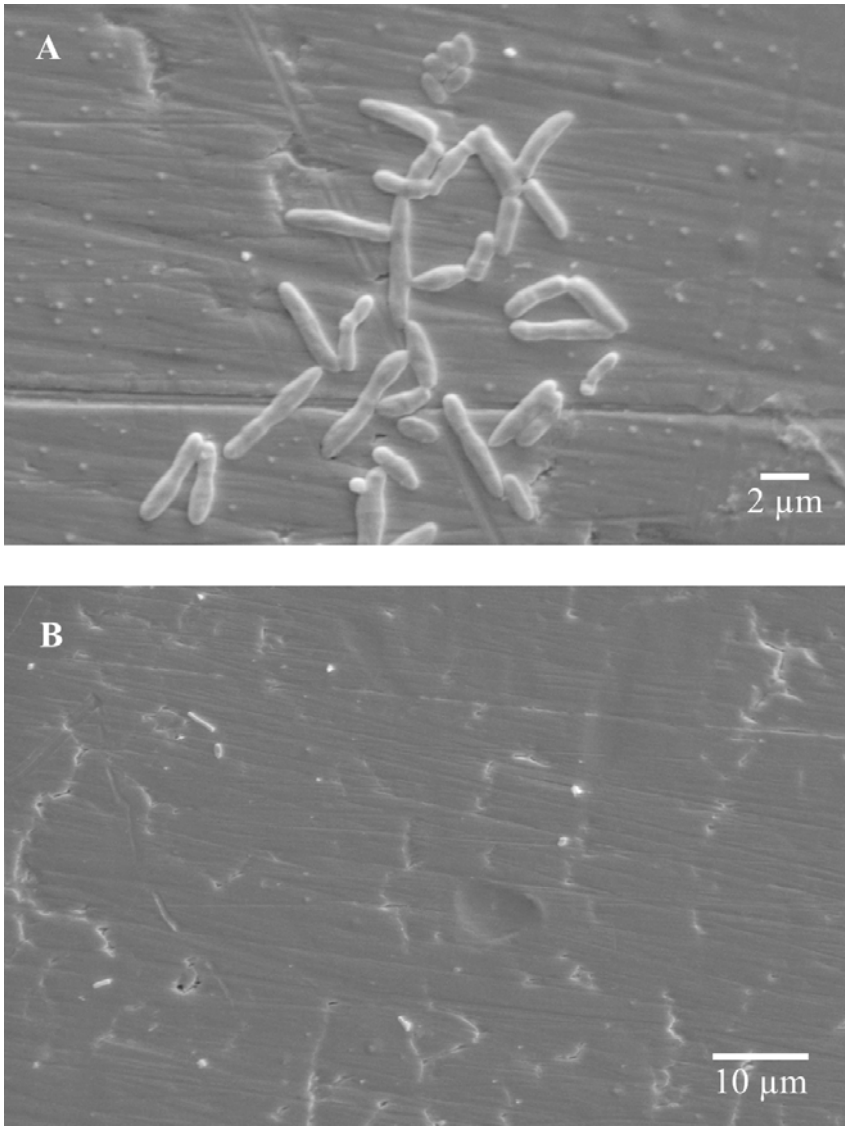


FIGURA 2 Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 3 horas de contato a 37°C, utilizando-se meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato. (A) Células aderidas à superfície, em sua maioria, em processo de fissão binária. (B) Visão de maior área do cupom, mostrando a pouca adesão das células.

A adesão de bactérias à superfície ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (Mittelman, 1998). Durante a adesão reversível, bactérias são facilmente removidas pela aplicação de forças mínimas (Watnick & Kolter, 2000; Chmielewski & Frank, 2003). A adesão irreversível inicia-se após 20 minutos a, no máximo, 4 horas de contato a 4º-20ºC (Hood & Zottola, 1995; Smoot & Pierson, 1998) e apresenta sérios riscos e indústria de alimentos, uma vez que a remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanificantes ou calor (Sinde & Carballo, 2000). Dessa forma, a probabilidade de permanência de células aderidas irreversivelmente após procedimentos de higienização é grande e corresponde a uma das principais razões da formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos. Este risco é agravado no que diz respeito a *L. monoctogenes*, pois se observou, neste estudo, que esta bactéria apresenta capacidade de rápida adesão à superfície de aço inoxidável, podendo atingir o estágio irreversível em poucas horas.

Mesmo com a adição de novo meio de cultura sem inóculo, após 48 horas de cultivo até as 192 horas, o número de células bacterianas aderidas à superfície permaneceu praticamente constante (Tabela 1). Neste período, observou-se somente adesão bacteriana, ou seja, não ocorreu a formação de biofilme maduro. Pela MEV, observou-se, após 144 horas de contato, que a distribuição das células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície mostrou-se uniforme. Entretanto, observou-se que, em alguns locais, a densidade celular ainda é menor (Figura 3A) que em outros (Figura 3B). Nesta etapa, não foi observada a presença ou a formação de microcolônias, como observado na etapa anterior (3 horas), o que pode ser explicado pela possível variabilidade existente entre os cupons de aço inoxidável, no que diz respeito à adesão bacteriana. Observou-se também, nesta etapa (144 horas), que, apesar do número de células

aderidas à superfície ser semelhante ao encontrado após 3 horas de formação do biofilme (Tabela 1), o resultado obtido pela MEV (Figura 3A e 3B) difere completamente do encontrado às 3 horas (Figura 2A e 2B). Dessa forma, pode-se concluir que, mesmo com a semelhança entre o número de células aderidas após 3 e 144 horas, a maneira de disposição destas células na superfície pode se modificar com maior tempo de contato entre células e superfície de adesão, tornando-se mais uniforme.

Resultados semelhantes foram observados por Kalmokoff et al. (2001), que estudaram a formação de biofilme por diferentes cepas de *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável. Após 72 horas de contato a 21°C, utilizando como substrato o meio de cultura caldo infusão cérebro coração, os autores observaram, pela MEV, que a grande maioria das cepas não formou biofilme nestas condições e sim aderiram de forma uniforme à superfície. Apesar de haver diferenças na densidade de células aderidas entre as cepas, poucos agrupamentos celulares foram observados.

Após 240 horas, observou-se aumento do número de células aderidas, sendo a contagem encontrada de 5,64 Log UFC.cm^{-2} (Tabela 1). A diferenciação entre o que seja adesão e o que seja biofilme tem sido proposta em função da quantidade de células presentes por cm^2. Um dos valores mais citados atualmente é o proposto por Andrade et al. (1998) que estudaram a adesão de *Enterococcus faecium* à superfície de aço inoxidável e enfatizaram que, para que ocorra formação de biofilmes bacterianos, são necessárias contagens acima de 7 Log UFC.cm^{-2}. Entretanto, para a diferenciação entre adesão e biofilme deve ser observada a espécie bacteriana envolvida, pois sabe-se que espécies distintas irão apresentar diferentes comportamentos de adesão e formação de biofilmes. Dessa forma, neste estudo, foram consideradas apenas as proposições realizadas especificamente para *L. monocytogenes*.

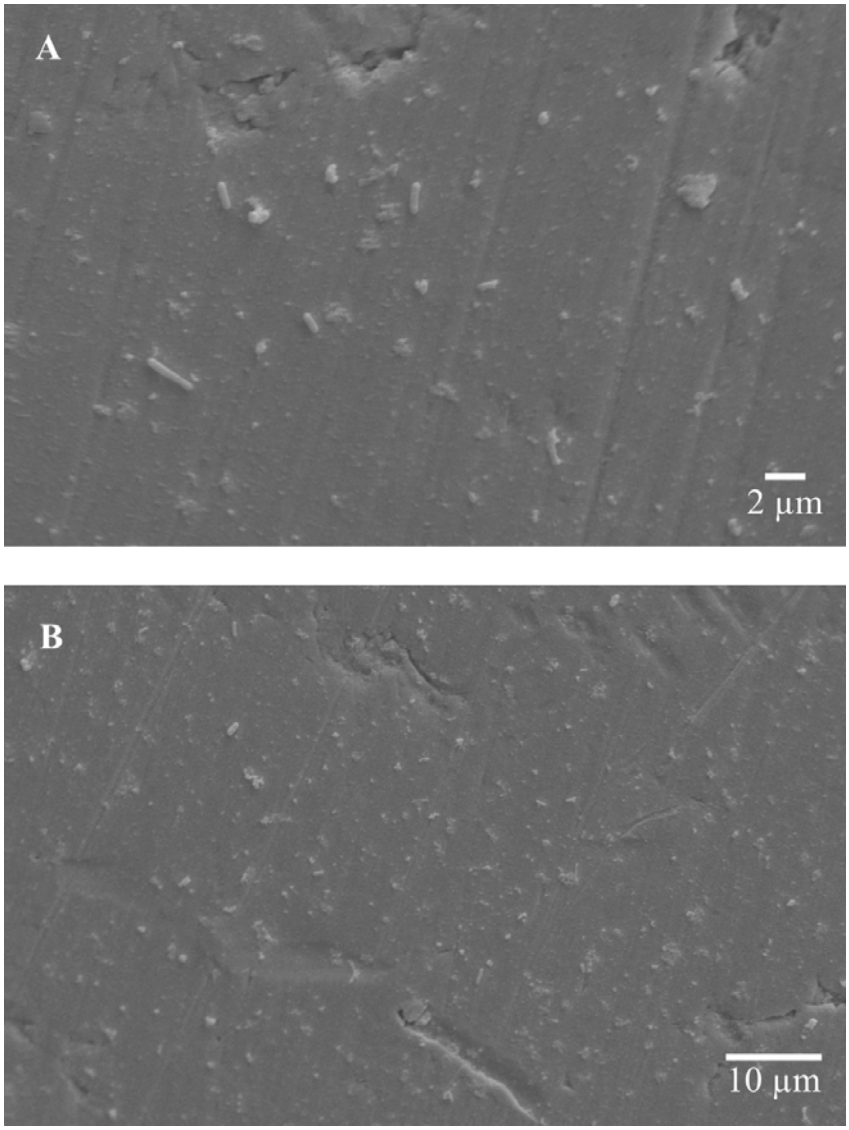


FIGURA 3 Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 144 horas de contato a 37°C, utilizando-se meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato. (A) Menor densidade celular. (B) Maior densidade celular.

L. monocytogenes possui capacidade de aderir rapidamente a superfícies de aço inoxidável (Ronner & Wong, 1993; Briandet et al., 1999). Em contrapartida, não é capaz de formar biofilmes expessos constituídos por várias camadas (9 a 12 Log UFC.cm^{-2}), mais sim de aderir a superfíceis em níveis que variam de 4 a 6 Log UFC.cm^{-2} (Gram et al., 2007), o que está de acordo com os valores e eletromicrografias de varredura obtidos neste estudo. Ronner & Wong (1993), estudando o desenvolvimento de biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável, observaram que contagens acima de 5 Log UFC.cm^{-2}, como a obtida após 240 horas de cultivo neste experimento, podem indicar a formação do biofilme maduro e não apenas adesão bacteriana.

Dando continuidade aos seus estudos, Chae & Schraft (2001) promoveram a formação de biofilme por *L. monocytogenes* Murray e 7148 sobre superfície de cupons de vidro por 240 horas de incubação a 37°C, utilizando TSB como substrato. Foram observadas contagens de, aproximadamente, 6 Log UFC.cm^{-2} para *L. monocytogenes* Murray e 5 Log UFC.cm^{-2} para *L. monocytogenes* 7148, dados compatíveis com os encontrados neste trabalho para aço inoxidável.

Assim como após 3 horas, após 240 horas, observaram-se, pela MEV, duas diferentes situações referentes à distribuição das células aderidas à superfície. Na primeira situação, observou-se a formação de pequenas microcolônias onde houve também a presença de substâncias poliméricas extracelulares (Figura 4A). Esta observação, juntamente com a contagem de células bacterianas aderidas à superfície às 240 horas (5,64 Log UFC.cm^{-2}), enfatiza a formação do biofilme maduro nesta etapa e não apenas adesão bacteriana. Entretanto, enfatiza-se que o biofilme formado não cobre totalmente à superfície. Em contrapartida, em alguns locais, as células estavam distribuídas uniformemente sobre a superfície (Figura 4B), de maneira semelhante à observada às 144 horas (Figura 3A e 3B), o que demonstra que a maturação e

desenvolvimento do biofilme não ocorrem de maneira idêntica em toda a superfície.

Neste estudo, observou-se a produção de poliméricas extracelulares por *L. monocytogenes* após 240 horas de formação do biofilme. A produção de polímeros extracelulares por esta espécie, apesar de existente, é pouco estudada (Chae et al., 2006). Borucki et al. (2003) observaram a formação de exopolissacarídeos por diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Segundo os autores, as cepas com maior capacidade de formação de biofilmes foram aquelas que mais produziram exopolissacarídeos. Isso enfatiza que a produção de polímeros extracelulares, como a observada às 240 horas neste estudo (Figura 4A), é ponto chave na maturação do biofilme desta espécie.

A formação do biofilme maduro ocorre de 72 a 144 horas após a adesão inicial, podendo chegar a 240 horas (Heydorn et al., 2000). A maturidade acontece principalmente por meio do aumento da densidade populacional e também pela pronunciada produção e deposição de polímeros extracelulares, aumentando a espessura do biofilme (Cheng et al., 2007). Esses polímeros extracelulares são produzidos pelas células estabelecidas dentro da estrutura do biofilme (Zhang et al., 1998) e são compostos por diversas substâncias, incluindo polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Nielsen et al., 1996; Tsuneda et al., 2003). A matriz de substâncias poliméricas extracelulares é responsável pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme. Sua composição química, heterogênea e complexa, determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas do biofilme (Flemming & Wingender, 1999). Na indústria de alimentos, confere resistência aos procedimentos de higienização comumente empregados (Gilbert & McBain, 2003), fazendo com que biofilmes maduros dificilmente sejam completamente removidos destas superfícies.

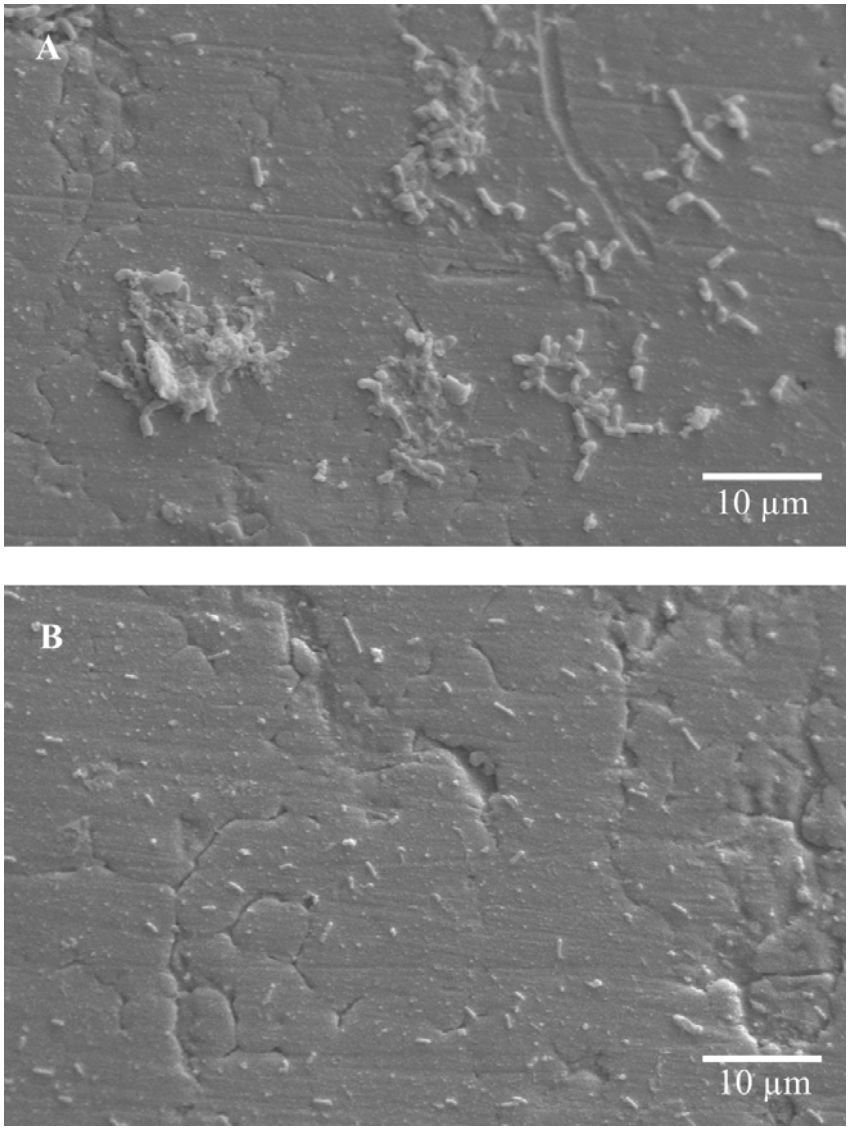


FIGURA 4 Eletromicrografias de varredura mostrando a adesão de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), após 240 horas de contato a 37°C, utilizando-se meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato. (A) Biofilme maduro. (B) Células aderidas uniformemente.

Um dos grandes problemas da formação de biofilmes na indústria alimentícia ou em outras áreas é o desprendimento de células, o que o torna fonte constante de contaminação do microrganismo no alimento, água ou em novos processos infecciosos. Assim, a avaliação do potencial de biotransferência do microrganismo se torna interessante. Este pôde ser observado pelos valores encontrados a partir das 96 horas de formação do biofilme. As contagens de células planctônicas encontradas (Tabela 1) indicam que o desprendimento de células de *L. monocytogenes* da superficie de aço inoxidável foi praticamente constante nas estapas analisadas (96, 144, 192 e 240 horas), demonstrando que esta capacidade é independente da necessidade de maturação total do biofilme, o que contradiz o relatado por diversos autores (Christensen & Characklis, 1990; Joseph et al., 2001; Sauer et al., 2002; Chmielewski & Frank, 2003; Hunt et al., 2003; Trachoo, 2003). Os elevados valores encontrados em todas as etapas analisadas (>9 Log UFC.mL^{-1}) podem ser atribuídos ao fornecimento de condições adequadas de crescimento, como temperatura e nutrientes necessários. Soma-se a estes fatores a condição de célula planctônica, a qual está completamente imersa no meio de cultura, metabolizando rapidamente os nutrientes dispersos no substrato, o que facilita a obtenção de energia e faz com que a divisão celular ocorra em pouco tempo.

A rápida capacidade de adesão à superficie, somada ao potencial de biotransferência durante todas as etapas de formação do biofilme, fazem de *L. monocytogenes* um risco potencial à indústria de alimentos. Uma vez presente na matéria-prima, *L. monocytogenes* irá aderir rapidamente à superficie de equipamentos e utensílios de aço inoxidável, onde poderá se multiplicar, formando biofilmes maduros em pouco tempo. O potencial de biotransferência e a capacidade de sobrevivência e de multiplicação em diferentes substratos farão com que esta bactéria atinja rapidamente doses infectantes. Hood & Zottola (1997) observaram o crescimento de *L. monocytogenes* em leite desnatado a

23°C. A bactéria atingiu contagens >8 Log UFC.mL^{-1} após 20 horas de incubação, a partir de um inóculo inicial de 5 Log UFC.mL^{-1}. Gram et al. (2007) observaram o crescimento de *L. monocytogenes* em suco de salmão defumado e emulsão de carne a 20º e 30°C. A bactéria atingiu contagens 9 Log UFC.mL^{-1} após 20 horas de incubação, a partir de um inóculo inicial de 6 Log UFC.mL^{-1}, em ambos os substratos.

Com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que o modelo experimental desenvolvido e a metodologia utilizada foram eficientes no estudo da formação do biofilme por *L. monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável. Este fato é assegurado pela semelhança dos resultados obtidos neste trabalho com os disponíveis na literatura. Todavia, observa-se que o estudo da formação de biofilmes bacterianos deve abranger, além da contagem em placas do número de células aderidas à superfície, métodos de microscopia. Por meio deles é possível observar não só o aumento da população bacteriana, mas também aspectos fundamentais, como o arranjo das células na superfície e a presença de substâncias poliméricas extracelulares, responsáveis pela coesão e a proteção das células presentes na estrutura do biofilme. Assim, conclui-se que esta é uma técnica útil a ser empregada em estudos posteriores baseados na adesão bacteriana e formação de biofilmes sobre superfície de aço inoxidável, bem como estudos realizados no intuito de desenvolver métodos de remoção das células aderidas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARROS, M. de A. F.; BELOTI, V.; HAGA, M. M.; CAVALETTI, L.; OVÍDIO, L.; MONTEIRO, F. A.; NERO, L. A. *Listeria* spp. ocorrência em equipamentos e ambientes de processamento de carne bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 341-348, out./dez. 2004.

BORUCKI, M. K.; PEPPIN, J. D.; WHITE, D.; LOGE, F.; CALL, D. R. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7336-7342, Dec. 2003.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

BRIANDET, R.; LERICHE, V.; CARPENTIER, B.; BELLON-FONTAINE, M. N. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 62, n. 9, p. 994-998, Sept. 1999.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Microbiology**, London, v. 18, n. 1, p. 103-112, Feb. 2001.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 103-111, Dec. 2000.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 3, p. 250-259, May 2006.

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G.; ADRIÃO, A.; FALEIRO, L.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C.; ANDREW, P. W.; TENREIRO, R. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of

identification, typing and spatial–temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 52-63, May 2007.

CHASSEIGNAUX, E.; GERAULT, P.; TOQUIN, M.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, n. 2, p. 271-275, May 2002.

CHENG, C.; ZHANG, Z.; CHEN, S.; BRYERSAND, J. D.; JIANG, S. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 28, n. 29, p. 4192-4199, Oct. 2007.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CHRISTENSEN, B. E.; CHARACKLIS, W. G. Physical and chemical properties of biofilms. In: CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K. C. (Ed.). **Biofilms**. New York: J. Wiley and Sons, 1990. p. 93-130.

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

CRUZ, C. D.; SILVESTRE, F. A.; KINOSHITA, E. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 375-383, 2008.

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

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-15, Jan. 2007.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence os antibiotic resistence. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 2, p. 189-208, Apr. 2003.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 2007.

HEYDORN, A.; ERSBØLL, B. K.; HENTZER, M.; PARSEK, M. R.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology**, London, v. 146, n. 10, p. 2409-2415, Oct. 2000.

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

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

HUNT, S. M.; HAMILTON, M. A.; SEARS, J. T.; HARKIN, G.; RENO, J. A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms. **Microbiology**, London, v. 149, n. 5, p. 1155-1163, May 2003.

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

KALMOKOFF, M. L.; AUSTIN, J. W.; WAN, X. D.; SANDERS, G.; BANERJEE, S.; FARBER, J. M. Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 725-734, Oct. 2001.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P. da; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M. da; VARGAS, A. C. de. *Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan./fev. 2001.

LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; ORTIZ, S.; LÓPEZ, P.; NAVAS, J.; DÁVILA, J. C.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1/2, p. 130-134, Jan./Feb. 2008.

LUNDEN, J. M.; AUTIO, T. J.; KORKEALA, H. J. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants

associated with a dicing machine. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 7, p. 1129-1133, July 2002.

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

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

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

NIELSEN, P. H.; FRØLUND, B.; KEIDING, K. Changes in the composition of extracellular polymeric substances in activated sludge during anaerobic storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 44, n. 6, p. 823-830, Feb. 1996.

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

PALMER JUNIOR, R. J. Microscopy flowcells: perfusion chambers for real-time study of biofilms. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 310, p. 160-166, 1999.

PAN, Y.; BREIDT JUNIOR, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7711-7717, Dec. 2006.

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

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypoclorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 81-85, Oct. 2000.

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

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 155-159, Dec. 2000.

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

SMOOT, L. M.; PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 10, p. 1293-1298, Oct. 1998.

TORRES, K.; SIERRA, S.; POUTOU, R.; CARRASCAL, A.; MERCADO, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes,* microorganismo zoonótico emergente. **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v. 10, n. 1, p. 511-543, 2005.

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

TSUNEDA, S.; AIKAWA, H.; HAYASHI, H.; YUASA, A.; HIRATA, A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, n. 2, p. 287-292, June 2003.

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

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2765-2770, Oct. 1998.

ZHANG, X. Q.; BISHOP, P. L.; KUPFERLE, M. J. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. **Water Science and Technology**, London, v. 37, n. 4/5, p. 345-348, 1998.

CAPÍTULO 4

AÇÃO SANIFICANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cymbopogon* sp. EM DIFERENTES ETAPAS DA FORMAÇÃO DO BIOFILME POR *Listeria monocytogenes* SOBRE SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

1 RESUMO

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. Ação sanificante de óleos essenciais de *Cymbopogon* sp. em diferentes etapas da formação do biofilme por *Listeria monocytogenes* sobre superfície de aço inoxidável. In: _____. **Formação de biofilme em aço inoxidável, biotransferência e sensibilidade de *Listeria monocytogenes* a óleos essenciais**. 2009. cap. 4, p. 116-148. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Soluções sanificantes à base de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, puros e em combinação, e uma solução sanificante controle foram testadas em duas etapas (3 e 240 horas) de formação do biofilme por *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4). As soluções sanificantes à base de óleo essencial mostraram-se efetivas na redução do número de células aderidas à superfície, principalmente após 60 minutos de contato. A solução sanificante constituída da combinação dos óleos essenciais foi capaz de reduzir em 100% (5,64 Log UFC.cm^{-2}) o número de células aderidas após 60 minutos de contato, às 240 horas de formação do biofilme. Por microscopia eletrônica de varredura observaram-se alterações estruturais na superfície bacteriana, provavelmente causadas pela atuação dos óleos essenciais na membrana citoplasmática. Óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, puros e em combinação, são novas alternativas para a sanificação de superfícies industriais de aço inoxidável contaminadas por *L. monocytogenes*.

Palavras-chaves: *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, sanificantes naturais.

.

*Comitê Orientador: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Orientadora) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-orientadora)

2 ABSTRACT

OLIVEIRA, Maíra Maciel Mattos de. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils at different stages of the biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. In: _____. **Biofilm formation on stainless steel, biotransfer and sensitivity of *Listeria monocytogenes* to essential oils**. 2009. chap. 4, p. 116-148. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Disinfectant solutions based on essential oils of *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. and *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, pure and in combination, and a control disinfectant solution, were tested in two stages (3 and 240 hours) of the *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 biofilm formation on the surface of stainless steel AISI 304 (#4). The essential oil based disinfectant solutions were shown effective in the reduction of the number of surface adhered cells, mainly after 60 minutes of contact. The disinfectant solution made up of the combination of essential oils was capable of reducing 100% (5.64 Log UFC.cm^{-2}) of the number of cells adhered after 60 minutes of contact, at 240 hours of biofilm formation. As for SEM, structural alterations were observed in the bacterial surface, probably caused by the performance of the essential oils in the cytoplasmatic membrane. Essential oils of *C. citratus and C. nardus,* pure and in combination are new alternatives for the disinfection of industrial stainless steel surfaces contaminated by *L. monocytogenes.*

Key words: *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, natural disinfectant.

*Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – DCA/UFLA (Adviser) e Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso – DQI/UFLA (Co-adviser)

3 INTRODUÇÃO

A adesão de bactérias, com subsequente formação de biofilmes, em ambientes de processamento de alimentos, é fonte potencial de contaminação que pode levar à deterioração de alimentos ou à transmissão de toxinfecções alimentares. Em indústrias processadoras de alimentos, superfícies de equipamentos e utensílios de aço inoxidável são reconhecidas como os principais locais de adesão bacteriana e formação de biofilmes (Wong, 1998; Chmielewski & Frank, 2003).

Nos últimos anos, programas de limpeza e sanificação eficientes, que eliminem o risco de contaminação de alimentos por microrganismos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, tornaram-se prioridade (Gibson et al., 1999). Elevado número de estudos objetivando encontrar estratégias efetivas tem sido publicado (Gandhi & Chikindas, 2007). A busca por novas substâncias que possam ser utilizadas como sanificantes tornou-se nova área de pesquisa. A crescente percepção negativa dos consumidores contra compostos químicos sintéticos tem movido esta busca em direção ao desenvolvimento de alternativas consideradas "naturais" (Roller, 1995; Davidson, 1997). Assim, os óleos essenciais de plantas condimentares, aromáticas e medicinais, que são agentes antibacterianos naturais muito potentes (Burt, 2004; Oussalah et al., 2007; Bakkali et al., 2008), têm tido, recentemente, sua atividade antibacteriana sob biofilmes avaliada, visando à possível utilização desses metabólitos secundários ou de seus constituintes como agentes sanificantes na indústria de alimentos (Knowles et al., 2005; Lebert et al., 2007; Chorianopoulos et al., 2008; Sandasi et al., 2008). Os resultados encontrados nos trabalhos já realizados são promissores, entretanto, ainda divergentes. Segundo Chorianopoulos et al. (2008), as informações disponíveis sob a utilização de óleos essenciais como

sanificantes ainda são limitadas, o que demonstra a necessidade de realização de mais estudos sobre o assunto.

Inúmeros microrganismos são capazes de participar do processo de adesão e formação de biofilmes. Na indústria de alimentos, eles podem ser divididos em deterioradores e patogênicos. No que diz respeito aos microrganismos patogênicos, *Listeria monocytogenes* pode ser enfatizada por sua resistência ao calor e a elevadas concentrações de sais, sobrevivência em temperaturas de refrigeração, capacidade de colonização de superfícies e veiculação de infecções de origem alimentar de alta gravidade (Torres et al., 2005; Pan et al., 2006; Gandhi & Chikindas, 2007). Essas propriedades tornam esta bactéria difícil de ser controlada em ambientes de processamento de alimentos, sendo, por este motivo, comumente encontrada em indústrias processadoras de carne e nos produtos cárneos (Senczek et al., 2000; Chasseignaux et al., 2002; López et al., 2008; Cruz et al., 2008), leite e derivados lácteos (Chambel et al., 2007).

A família Poaceae é uma das maiores famílias de plantas que abrange cerca de 500 gêneros e aproximadamente 8.000 espécies essencialmente herbáceas, denominadas genericamente de gramíneas (University of Hawaii, 2008). O gênero *Cymbopogon* é o mais representativo quanto à produção de óleos essenciais, uma vez que poucas gramíneas são aromáticas (Ortiz et al., 2002). A atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. (capim-limão) e *Cymbopogon nardus* L. Rendle (capim-citronela) já foi demonstrada *in vitro* frente a *L. monocytogenes* (Oussalah et al., 2007).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação sanificante dos óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus*, puros e em combinação, em duas etapas da formação do biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19117 sobre superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), utilizando contagem padrão em placas e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A MEV foi realizada com o intuito

de observar a ocorrência de alterações estruturais na superfície bacteriana, devido à ação antibacteriana dos óleos essenciais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de execução do experimento

As análises referentes à extração e à avaliação dos teores dos constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, Brasil. A análise qualitativa dos óleos essenciais foi realizada no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS), em Aracaju, SE, Brasil. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA) da UFLA. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) da UFLA.

4.2 Microrganismo utilizado, padronização, estocagem e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado foi *L. monocytogenes* ATCC 19117, adquirido da Seção de Coleção de Culturas da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, SP, Brasil. Para a padronização do número de células, a cepa foi inicialmente inoculada em um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia), o qual foi incubado a 37°C. Em seguida, a partir do TSB, a curva de crescimento foi determinada pela realização periódica de leituras da absorbância da cultura a 600 nm e de diluições seriadas em solução salina [NaCl 0,9% (p/v)] com posterior plaqueamento em superfície para a determinação do Log UFC.mL^{-1}, utilizando-se como meio de cultura ágar triptona de soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Maharashtra, Índia).

Durante a realização de todo o experimento, a cepa foi estocada sob refrigeração em meio de cultura de congelamento (por 100 mL de água destilada: 15 mL de glicerol; 0,5 g de peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g de NaCl; pH 7,2±7,4). Para reativação e utilização da cepa, uma alíquota do meio de cultura de congelamento foi transferida para tubos de ensaio contendo TSB, sendo realizados dois repiques consecutivos com incubação a 37°C, por 24 horas, neste meio de cultura. Em seguida, a cultura foi estriada em TSA vertido em placas de Petri e incubada a 37°C, por 24 horas. Das colônias formadas na superfície do TSA, uma alçada foi retirada e transferida para um frasco Erlenmeyer contendo 150 mL de TSB, o qual foi incubado a 37°C, até atingir o número de células necessárias para a utilização no experimento, aproximadamente 9,17 Log UFC.mL^{-1} (OD_{600nm}=0,895).

4.3 Modelo experimental de formação do biofilme

O modelo experimental de formação do biofilme por *L. monocytogenes* foi elaborado segundo sistema proposto por Gram et al. (2007) e consistiu nos seguintes itens: suporte de aço inoxidável AISI 304 (#4), composto por 4 divisões, cada qual dando lugar ao apoio de 21 cupons de aço inoxidável AISI 304 (#4) (1 x 8 x 18 mm), dispostos verticalmente; béquer de 1.000 mL; barra magnética e agitador magnético, utilizado com a finalidade de permitir a livre circulação do substrato dentro do béquer. O béquer foi lacrado com o auxílio de placa de Petri e filme plástico. O aço inoxidável AISI 304 (#4) foi o escolhido por ser o mais utilizado na indústria de alimentos.

4.4 Preparo dos cupons e suporte de aço inoxidável

Para proceder à etapa de adesão das células bacterianas, tanto os cupons quanto o suporte de aço inoxidável foram previamente higienizados e esterilizados. Para tanto, foram limpos com acetona 100%, lavados por imersão

em detergente alcalino [NaOH 1% (p/v), pH 13,2] por 1 hora, enxaguados com água destilada esterilizada, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, foram novamente lavados com água destilada esterilizada, secos por 2 horas, a 60ºC e autoclavados, a 121ºC, por 15 minutos (Rossoni & Gaylarde, 2000).

4.5 Adesão das células bacterianas à superfície dos cupons de aço inoxidável

Inicialmente, 1.000 mL de TSB previamente esterilizado e 70 mL de TSB contendo a cultura bacteriana foram adicionados ao béquer contendo a barra magnética, perfazendo a concentração final de, aproximadamente, 8 Log $UFC.mL^{-1}$. Em seguida, o suporte de aço inoxidável contendo os cupons foi disposto no interior do béquer, o qual foi lacrado e incubado a 37ºC, sob agitação de 50 rpm. A cada 48 horas, os cupons foram retirados do suporte e mergulhados 3 vezes em solução salina, objetivando-se a remoção das células planctônicas. A seguir, os cupons foram dispostos em novo suporte esterilizado, o qual foi imerso em 1.000 mL de TSB em um béquer contendo barra magnética. Tanto o TSB como o béquer e a barra magnética encontravam-se esterilizados. Na sequência, o sistema foi lacrado e incubado a 37ºC sob agitação de 50 rpm. Esse procedimento foi repetido a cada 48 horas, completando 240 horas de incubação, visando à formação do biofilme maduro.

4.6 Óleos essenciais

4.6.1 Extração, identificação e quantificação dos constituintes químicos

Foram utilizadas 2.000 gramas de folhas frescas de *C. citratus* e *C. nardus* coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA. A coleta foi realizada em janeiro de 2008, às 8 horas da manhã, em um dia com temperatura amena e sem precipitação pluviométrica. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais, Brasil, a 21º14' S, longitude de 45º00' W Gr. e 918 m

de altitude. De acordo com Dantas et al. (2007), o clima, segundo a classificação climática de Köppen, é Cwa, temperado chuvoso (mesotérmico) com inverno seco e verão chuvoso, subtropical, com inverno seco e temperatura do mês mais quente maior que 22°C (22,8°C em fevereiro).

A extração dos óleos essenciais foi realizada empregando-se o método de hidrodestilação e o aparelho de Clevenger modificado. Para tal, as folhas frescas de *C. citratus* e *C. nardus* foram picadas e colocadas, juntamente com água, em balão volumétrico com capacidade de 4 litros. O balão foi acoplado ao aparelho de Clevenger modificado e a extração foi realizada pelo período de 2,5 horas, controlando-se a temperatura a, aproximadamente, 100°C. O hidrolato obtido foi centrifugado a 321,8 x G, por 5 minutos, sendo o óleo essencial retirado com auxílio de pipeta de Pasteur e estocado à temperatura de refrigeração em frascos de vidro envoltos em papel alumínio (Guimarães et al., 2008).

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG/(EM). O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu CG-17A equipado com detector seletivo de massa modelo QP5050A. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280ºC; programação da coluna com temperatura inicial de 50°C, por 2 minutos, com um aumento de 4°C/min, até 200°C; depois, 10°C/min até 300°C, finalizando com temperatura de 300°C por 10 minutos; gás carreador hélio ($1mL.min^{-1}$); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa de split 1:83 e volume injetado de 0,5 μL (1% de solução em diclorometano). Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto de 70 eV; velocidade de decomposição 1.000, intervalo de decomposição de 0,50 e fragmentos de 40 Da e 550 Da decompostos. Foi injetada, nas mesmas

condições da amostra, uma série de padrões de hidrocarbonetos (C_9H_{20} ... $C_{26}H_{54}$). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e o índice Kovat`s (IK) calculado para cada constituinte foi comparado com o tabelado, de acordo com Adams (2001).

A quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17A equipado com detector por ionização de chamas (FID), nas seguintes condições operacionais: coluna capilar DB5; programação da coluna com temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, com aumento de 4°C/min, até 200°C, depois 10°C/min até 300°C, finalizando com uma temperatura de 300°C por 10 minutos; temperatura do injetor de 220ºC; temperatura de detector de 240ºC; gás carreador nitrogênio (2,2 $mL.min^{-1}$); taxa de split 1:10 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

4.6.2 Tratamento dos cupons de aço inoxidável com as soluções sanificantes

Para a elaboração das soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle (sem óleos essenciais) (Tabela1) foram utilizadas as proporções e diluentes sugeridos por Chorianopoulos et al. (2008), com modificação: a água destilada foi substituída por solução salina com 0,5% (v/v) de Tween 80. A solução salina foi utilizada no intuito de proporcionar concentração osmótica adequada à célula bacteriana, de modo que o efeito bactericida fosse atribuído somente aos óleos essenciais. O Tween 80 foi utilizado, assim como o etanol, como diluente dos óleos essenciais. Os óleos essenciais foram inicialmente diluídos em etanol e, em seguida, adicionados à solução salina com 0,5% (v/v) de Tween 80. A quantidade óleo essencial utilizada em cada solução sanificante foi baseada em estudos prévios do efeito bacteriostático frente a células planctônicas de *L. monocytogenes* (dados não

mostrados). Para cada solução sanificante à base de óleo essencial, a quantidade de óleo essencial utilizada foi a concentração mínima inibitória (CMI).

TABELA 1 Composição das soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle.

	Composição (%)		
Soluções sanificantes	**Óleo essencial**	**Etanol**	**Solução salina com 0,5% (v/v) de Tween 80**
C. nardus	3,12	16,88	80,00
C. citratus	1,56	18,44	80,00
Combinação[a]	1,56	18,44	80,00
Controle	0,00	20,00	80,00

[a]Combinação dos óleos essenciais de capim-limão e capim-citronela na proporção de 1:1.

A ação sanificante de cada solução frente às células bacterianas aderidas à superfície dos cupons de aço inoxidável foi avaliada em duas diferentes etapas da formação do biofilme: 3 e 240 horas. Para tanto, os cupons de aço inoxidável foram previamente mergulhados 3 vezes em solução salina, removendo-se, assim, as células planctônicas e, em seguida, imersos em 4 mL das soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle, durante 15 e 60 minutos, a 28°C, sob condições estáticas. A escolha dos tempos de contato foi realizada com base em estudos anteriores, em que o tempo de ação bactericida dessas soluções sanificantes foi determinado sob células planctônicas. Nesses estudos, o tempo de contato de 15 minutos foi o maior tempo necessário para a eliminação total das células planctônicas de *L. monocytogenes*. O limite de 60 minutos foi escolhido levando-se em

consideração a utilidade dessas soluções no processo de higienização em indústrias de alimentos.

4.7 Enumeração das células bacterianas aderidas

O número de células aderidas aos cupons de aço inoxidável foi determinado após os tratamentos com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle, as 3 e 240 horas de formação do biofilme. Visando estabelecer a redução do número de células aderidas após cada tratamento sanificante, também foram enumerados cupons as 3 e 240 horas sem nenhum tratamento sanificante. Inicialmente, os cupons foram mergulhados 3 vezes em solução salina, removendo-se, assim, qualquer resíduo das soluções sanificantes, bem como células planctônicas. Em seguida, as células aderidas foram retiradas utilizando-se *swabs* padronizados (15 mm x 25 mm) previamente esterilizados. Os *swabs* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina e agitados em vórtex por um minuto. Diluições seriadas até 10^{-6} foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo TSA, utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície. Após este procedimento, as placas de Petri foram incubadas, a 37ºC, por 24 horas.

4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Cupons de aço inoxidável submetidos aos tratamentos com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle nos dois tempos de contato, durante as duas etapas de formação do biofilme, foram analisados por MEV. Para tal, foram, inicialmente, imersos em solução fixadora (Karnovsky modificado: glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M e $CaCl_2$ 0,001M; pH 7,2) por um período mínimo de

24 horas. Após este período, foram lavados com tampão cacodilato por três vezes de 10 minutos. Após a lavagem, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em água durante 1 hora, à temperatura ambiente em capela de exaustão. Em seguida, foram lavados três vezes em água destilada e desidratados em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%, por três vezes). Posteriormente, foram conduzidos ao aparelho de ponto crítico (Bal-tec CPD 030) para completar a secagem, montados em *stubs* e cobertos com ouro no metalizador (Bal-tec CPD 050) (Bossola & Russell, 1998). Ao final desse procedimento, foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (EVO 040 Leo), obtendo-se as eletromicrografias.

4.9 Delineamento experimental e análise estatística

As diferentes etapas de formação do biofilme (3 e 240 horas) foram analisadas individualmente. Em cada experimento, foi adotado um esquema fatorial 4 x 2 (sanificantes x tempos de contato) disposto em delineamento em blocos casualizados. Foram utilizados três blocos e cada tratamento foi repetido duas vezes dentro de cada bloco. Quando detectadas diferenças significativas na análise de variância, as médias foram comparadas pelo teste t (LSD), a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Sisvar versão 4.6 (Ferreira, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A efetividade das soluções sanificantes utilizadas pode ser observada pelas contagens obtidas após o tratamento dos cupons de aço inoxidável contendo células sésseis de *L. monocytogenes* com as mesmas. A atuação das soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle diferiu entre as duas etapas de formação de biofilme analisadas. Às 3 horas de formação do biofilme, a solução sanificante à base de óleo essencial de *C. nardus* foi a mais efetiva, seguida pela solução sanificante constituída da combinação dos óleos essenciais de *C. nardus* e *C. citratus* ($P<0,05$). Nesta etapa, observou-se também que a solução sanificante à base do óleo essencial de *C. citratus* foi a menos efetiva, não diferindo da solução sanificante controle ($P>0,05$) (Tabela 2). Já às 240 horas, todas as soluções sanificantes à base de óleos essenciais mostraram-se superiores à solução sanificante controle ($P<0,05$). A solução sanificante constituída da combinação dos óleos essenciais de *C. nardus* e *C. citratus* foi mais efetiva que a solução sanificante à base de óleo essencial de *C. citratus* ($P<0,05$), entretanto, não diferiu da solução sanificante à base de óleo essencial de *C. nardus* ($P>0,05$). A efetividade da solução sanificante à base de óleo essencial de *C. nardus* não diferiu da efetividade da solução sanificante à base de óleo essencial de *C. citratus* ($P>0,05$) (Tabela 3).

TABELA 2 Número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC.cm^{-2}, às 3 horas de formação do biofilme, após tratamento com as soluções sanificantes a base de óleos essenciais e solução sanificante controle.

Sanificantes	Tempos de contato		Médias
	15 minutos	60 minutos	
Controle	4,20	2,88	3,54^{A}
C. citratus	2,92	2,71	2,82^{AB}
Combinação	2,81	2,48	2,64^{B}
C. nardus	2,04	0,58	1,31^{C}
Médias	2,99^{A}	2,16^{B}	

Médias seguidas da mesma letra na coluna para sanificantes e na linha para tempos de contato, não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de probabilidade (diferença mínima significativa = 0,85 para sanificantes e 0,60 para tempos de contato).

TABELA 3 Número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), em Log UFC.cm^{-2}, às 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle.

Sanificantes	Tempos de contato		Médias
	15 minutos	60 minutos	
Controle	5,05	4,48	4,76^{A}
C. citratus	4,14	1,55	2,84^{B}
C. nardus	2,36	1,18	1,77^{BC}
Combinação	1,77	0,00	0,88^{C}
Médias	3,33^{A}	1,80^{B}	

Médias seguidas da mesma letra na coluna para sanificantes e na linha para tempos de contato, não diferem entre si, pelo teste t (LSD), a 5% de probabilidade (diferença mínima significativa = 1,25 para sanificantes e 0,88 para tempos de contato).

O mecanismo de ação antibacteriana dos óleos essenciais presentes nas soluções sanificantes pode ser atribuído à natureza e às características de seus constituintes químicos. A estrutura química dos constituintes dos óleos

essenciais influencia seu modo de ação e atividade antibacteriana (Dorman & Deans, 2000). Os óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* apresentaram monoterpenos como principais constituintes químicos. Para o óleo essencial de *C. citratus*, os constituintes majoritários encontrados foram geranial (42,91%) e neral (30,90%) que, isomericamente, formam o citral. Em menor quantidade apresentaram-se 2-undecanona (4,12%), linalol (1,51%), mirceno (1,36%), geraniol (1,17%), (E)-β-ocimeno (0,20%) e (Z)-β-ocimeno (0,14%). Para o óleo essencial de *C. nardus*, houve predominância de citronelal (34,60%), geraniol (23,17%) e citronelol (12,09%), seguidos de β-elemeno (3,28%), γ-cadineno (2,93%), δ-cadineno (2,63%), acetato de citronelil (2,06%), germacreno D (1,78%), α-muuroleno (1,10%), limoneno (1,08%), geranial (0,57%), linalol (0,50%) e neo-isopulegol (0,25%).

O mecanismo de ação dos monoterpenos não é completamente compreendido, porém, sabe-se que este envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão, preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas de membrana (Sikkema et al., 1995). O acúmulo dos constituintes dos óleos essenciais na bicamada lipídica da membrana citoplasmática irá conferir a esta uma característica de permeabilidade. Em bactérias, a permeabilização da membrana citoplasmática está associada à dissipação da força próton motiva, no que diz respeito à redução do *pool* de ATP, do pH interno e do potencial elétrico, e à perda de íons, como íons potássio e fosfato (Bakkali et al., 2008). Dessa forma, danos estruturais à membrana citoplasmática levam ao comprometimento de suas funções como barreira seletiva e local de ação enzimática e geração de energia (Sikkema et al., 1994). Outras alterações de natureza antibacteriana devido à atuação de óleos essenciais são a coagulação do citoplasma (Gustafson et al., 1998) e a danificação de proteínas embebidas na membrana citoplasmática (Ultee et al., 1999).

O mecanismo de ação antibacteriana proposto para os óleos essenciais presentes nas soluções sanificantes foi confirmado pela MEV. Pela análise das eletromicrografias de varredura obtidas, foram observadas alterações estruturais na superfície celular. As células de *L. monocytogenes* apresentaram aspecto superficial rugoso, com consequente comprometimento da morfologia bacteriana. Essas alterações estruturais foram, provavelmente, causadas pela atuação dos óleos essenciais na membrana citoplasmática, provocando aumento da permeabilidade e extravasamento de constituintes intracelulares. Esses mecanismos de atuação foram observados para todos os tratamentos sanificantes à base de óleos essenciais utilizados. Contudo, pela MEV, não foi possível detectar diferenças evidentes entre a atuação das soluções sanificantes à base de óleos essenciais, bem como entre a atuação das mesmas nas duas etapas de formação de biofilme avaliadas (Figura 1 e 2). Como *L. monocytogenes* é gram-positiva, conclui-se que a parede celular não funciona como barreira à chegada desses compostos antibacterianos na membrana citoplasmática. Monoterpenos com atividade antibacteriana possuem como alvo a bicamada lipídica (Cristani et al., 2007) e, uma vez que a parede celular de bactérias gram-positivas é permeável, geralmente, não restringe a penetração desses agentes (Schaffer & Messner, 2005).

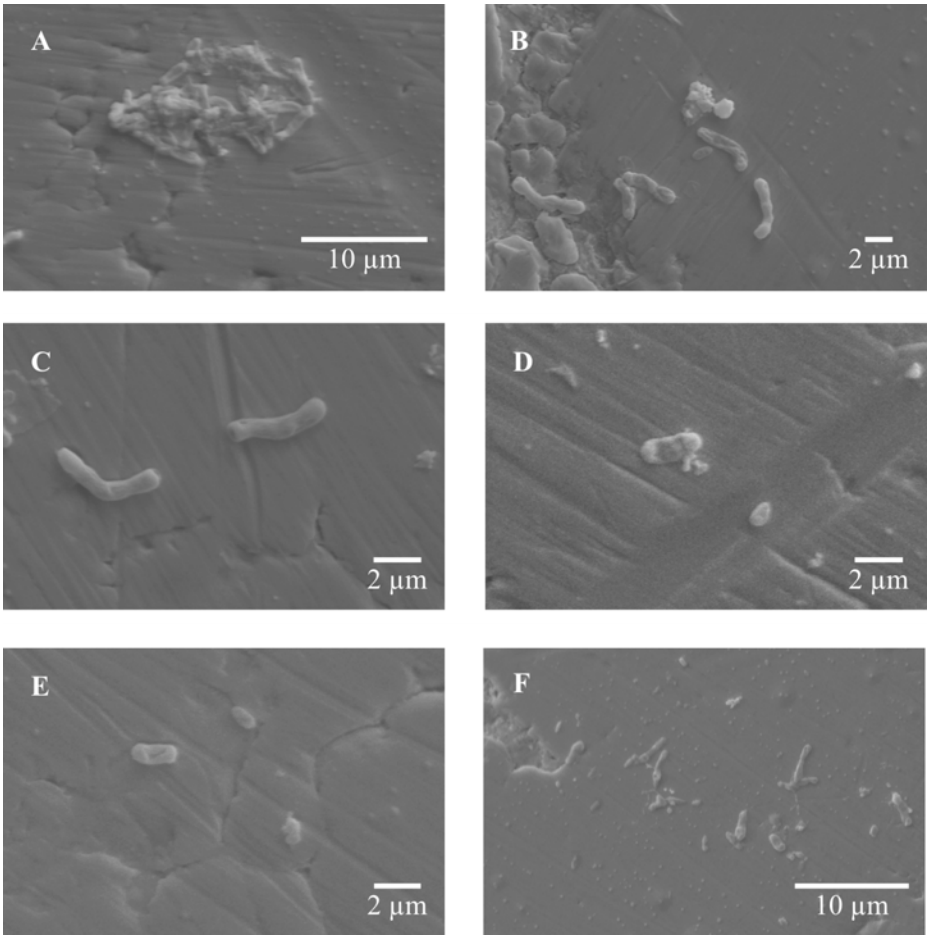


FIGURA 1 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 3 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas às soluções sanificantes à base de óleos essenciais, puros e em combinação. (A) *C. citratus*, 15 minutos de tempo de contato; (B) *C. citratus*, 60 minutos de tempo de contato; (C) *C. nardus*, 15 minutos de tempo de contato; (D) *C. nardus*, 60 minutos de tempo de contato; (E) combinação, 15 minutos de tempo de contato; (F) combinação, 60 minutos de tempo de contato.

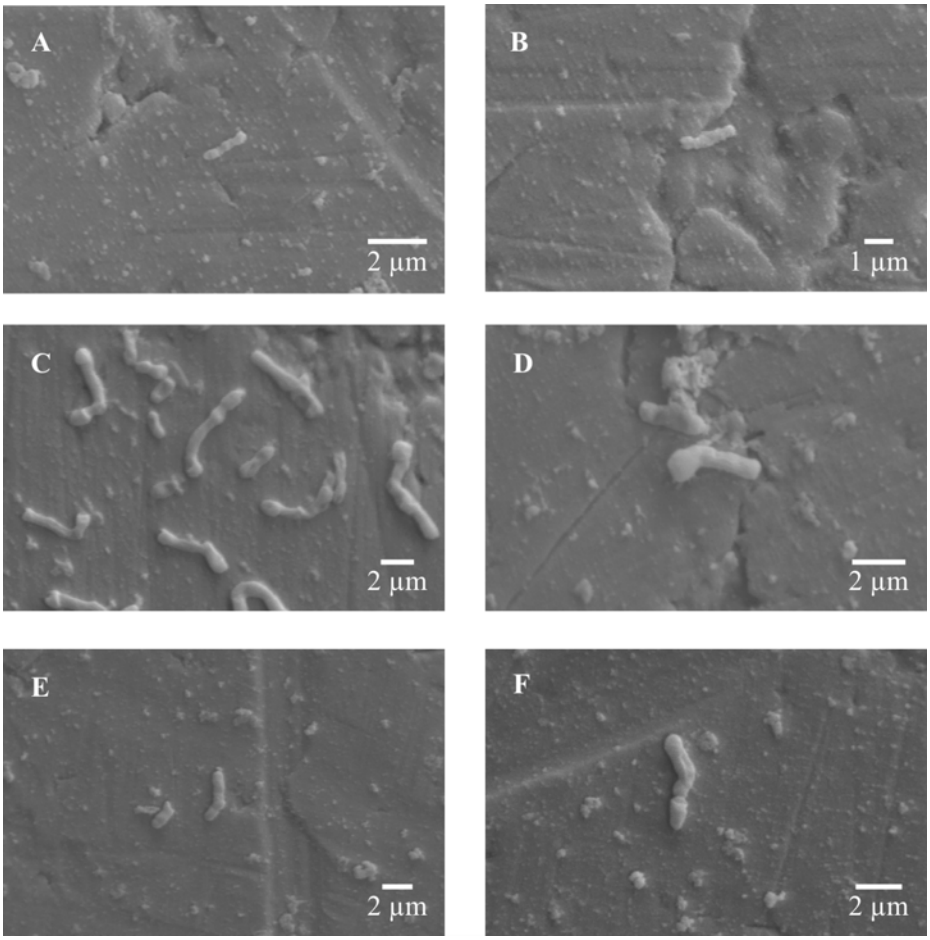


FIGURA 2 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas às soluções sanificantes à base de óleos essenciais, puros e em combinação. (A) *C. citratus*, 15 minutos de tempo de contato; (B) *C. citratus*, 60 minutos de tempo de contato; (C) *C. nardus*, 15 minutos de tempo de contato; (D) *C. nardus*, 60 minutos de tempo de contato; (E) combinação, 15 minutos de tempo de contato; (F) combinação, 60 minutos de tempo de contato.

A diferença encontrada entre a atuação das soluções sanificantes à base de óleos essenciais dentro de cada etapa de formação do biofilme analisada (Tabela 2 e 3) pode ser atribuída, principalmente, à composição química distinta dos mesmos. Diferenças na atividade antibacteriana existentes entre óleos essenciais de diferentes plantas ocorrem devido a fatores ecológicos e de crescimento e são relacionadas à concentração e à natureza de seus constituintes químicos, como composição, grupos funcionais, configuração estrutural dos componentes e possíveis interações sinergísticas (Chang et al., 2001).

A efetividade da solução sanificante controle observada às 3 horas de formação do biofilme, a qual não difere da efetividade da solução sanificante à base de óleo essencial de *C. citratus* (P>0,05) (Tabela 2), pode ser atribuída ao fato de a maioria das células sésseis de *L. monocytogenes* ainda se encontrar na etapa de adesão reversível. A adesão de bactérias à superfície ocorre em dois estágios: adesão reversível seguida por adesão irreversível (Mittelman, 1998). Durante a adesão reversível, bactérias são facilmente removidas pela aplicação de forças mínimas (Watnick & Kolter, 2000; Chmielewski & Frank, 2003), o que explica a redução da contagem de células sésseis após o tratamento com a solução sanificante controle às 3 horas de formação do biofilme. Já a remoção de células aderidas irreversivelmente é difícil e requer aplicação de forte força mecânica ou interrupção química da força de aderência pela aplicação de enzimas, detergentes, surfactantes, sanificantes ou calor (Sinde & Carballo, 2000). A adesão irreversível começa a partir de 20 minutos a, no máximo, 4 horas a 4º-20ºC (Hood & Zottola, 1995; Smoot & Pierson, 1998). Contudo, observou-se, pelas eletromicrografias de varreduras das células sésseis de *L. monocytogenes* tratadas com a solução sanificante controle, que nenhuma alteração na superfície bacteriana ocorreu (Figura 3 e 4).

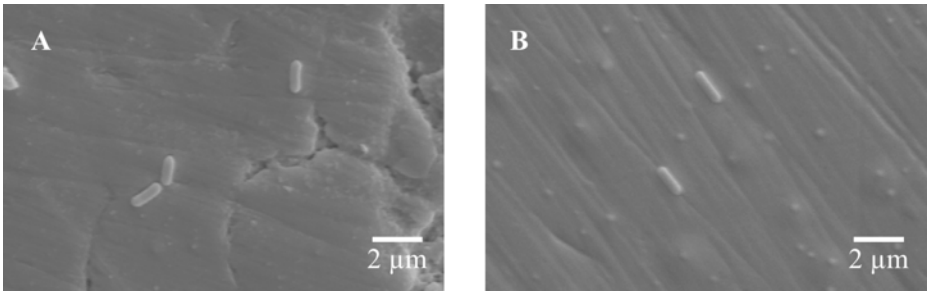


FIGURA 3 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 3 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas à solução sanificante controle (sem óleo essencial). (A) 15 minutos de tempo de contato e (B) 60 minutos de tempo de contato.

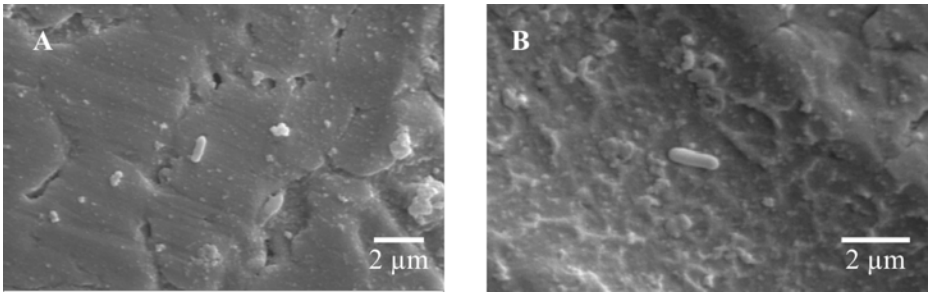


FIGURA 4 Eletromicrografias de varredura de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4) após 240 horas de contato a 37°C, utilizando meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) como substrato, submetidas à solução sanificante controle (sem óleo essencial). (A) 15 minutos de tempo de contato e (B) 60 minutos de tempo de contato.

No que diz respeito aos tempos de contato utilizados, observou-se que a ação das soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle foi mais efetiva após 60 minutos ($P<0,05$), para as duas etapas analisadas (3 e 240 horas) (Tabelas 2 e 3). Como a ação antibacteriana de óleos essenciais ocorre, principalmente, pelo aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática, com consequente extravasamento de conteúdo celular, observa-se que quanto maior o tempo de contato do microrganismo com a solução contendo o óleo essencial, maior será a perda de constituintes intracelulares. Segundo Denyer & Hugo (1991), apesar de certa quantia de extravasamento do conteúdo celular ser tolerada pelas bactérias sem perda da sua viabilidade, a perda extensiva de conteúdo ou a saída de moléculas essenciais e íons conduzirão à morte celular. Este fato pode explicar a maior efetividade do tempo de contato de 60 minutos, quando comparado ao tempo de contato de 15 minutos. Em contrapartida, pela MEV não foram observadas diferenças evidentes entre a atuação das soluções sanificantes à base de óleos essenciais, nos dois tempos de contato utilizados (Figura 1 e 2).

A efetividade de sanificantes é frequentemente determinada pelo número de células aderidas à superfície, obtido pela contagem padrão em placas, que são capazes de reduzir. As contagens obtidas a partir de cupons de aço inoxidável sem nenhum tratamento sanificante às 3 e às 240 horas de formação do biofilme foram utilizadas na determinação da redução do número de células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável, após tratamentos com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle. Todos os sanificantes à base de óleos essenciais mostraram-se efetivos na redução do número de células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície. Entretanto, merecem destaque os sanificantes a base de óleo essencial de *C. nardus* que, após 3 horas de formação do biofilme, no tempo de contato de 60 minutos, foi capaz de reduzir 88,13% das células aderidas (4,89 Log UFC.cm^{-2}),

e o sanificante constituído da combinação dos óleos essenciais de *C. nardus* e *C. citratus* que, após 240 horas de formação do biofilme, no tempo de contato de 60, foi capaz de reduzir 100% das células aderidas (5,64 Log UFC.cm-2). As menores reduções observadas ocorreram após tratamento com a solução sanificante controle. (Tabela 4). Segundo recomendações da *American Public Helth Association* (APHA, 1992), os agentes sanificantes físicos ou químicos devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de microrganismos deteriorantes em níveis aceitáveis, como, por exemplo, 0,3 Log UFC.cm^{-2} de microrganismos aeróbios mesófilos para superfícies de aço inoxidável ao fim do processo de higienização. Dessa forma, conclui-se que o sanificante constituído da combinação dos óleos essenciais de *C. nardus* e *C. citratus* mostrou-se eficiente e dentro das recomendações propostas.

TABELA 4 Redução no número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável AISI 304 (#4), às 3 e às 240 horas de formação do biofilme, após tratamento com as soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle.

Sanificantes	**3 horas**			
	15 minutos		**60 minutos**	
	Log UFC.cm^{-2*}	**%**	**Log UFC.cm^{-2*}**	**%**
Controle	0,69	14,11	2,01	41,11
C. citratus	1,97	40,28	2,18	44,58
Combinação	2,08	42,53	2,41	49,28
C. nardus	2,85	58,28	4,31	88,13
Sanificantes	**240 horas**			
	15 minutos		**60 minutos**	
	Log UFC.cm^{-2*}	**%**	**Log UFC.cm^{-2*}**	**%**
Controle	0,59	10,46	1,16	20,56
C. citratus	1,50	26,59	4,09	72,51
Capim-citronela	3,28	58,15	4,46	79,07
C. nardus	3,87	68,61	5,64	100,00

*Valores obtidos a partir da subtração do número de células aderidas aos cupons de aço inoxidável sem nenhum tratamento sanificante (4,89 Log UFC.cm^{-2} às 3 horas e 5,64 Log UFC.cm^{-2} às 240 horas) pelo número de células aderidas aos cupons de aço inoxidável que foram submetidos às soluções sanificantes à base de óleos essenciais e solução sanificante controle.

Observa-se, ainda, que a redução total do número de células aderidas à superfície apresentada pelo sanificante constituído da combinação dos óleos essenciais de *C. nardus* e *C. citratus* às 240 horas de formação do biofilme (Tabela 4) enfatiza a ação sinergística dos óleos essenciais utilizados. O termo sinergismo pode ser definido como o aumento da atividade de compostos ou fatores quando aplicados em conjunto, comparada à atividade dos mesmos, quando utilizados individualmente (Williamson, 2001; Ceylan & Fung, 2004). O estudo do sinergismo pela combinação de óleos essenciais de diferentes espécies de plantas já foi realizado *in vitro*, apresentando resultados promissores (Delaquis et al., 2002; Fu et al., 2007; Al-Bayati, 2008; Gutierrez et al., 2008).

Entretanto, não foi encontrado nenhum relato sob a ação sinergística da combinação de óleos essenciais frente a bactérias aderidas a superfícies.

Apesar dos elevados valores de redução obtidos após o tratamento com soluções sanificantes à base de óleos essenciais (Tabela 4), pela MEV pode-se observar que não houve remoção das células de *L. monocytogenes* aderidas à superfície. Dessa maneira, conclui-se que a redução do número de células aderidas observada pela contagem padrão em placas pode ser atribuída à injúria celular causada pelos óleos essenciais, o que caracteriza o efeito bactericida das soluções sanificantes à base de óleos essenciais utilizadas (Figuras 1 e 2). Para que estas células injuriadas fossem removidas, sugere-se, após a aplicação das soluções sanificantes à base de óleos essenciais, que seja feito um enxágue para a completa remoção de resíduos, utilizando, para isso, água sob pressão.

6 CONCLUSÕES

Óleos essenciais de *C. citratus* e *C. nardus* são novas alternativas para a sanificação de superfícies industriais de aço inoxidável contaminadas por *L. monocytogenes*. O efeito sinergístico da combinação dos mesmos não deve ser descartado e representa maneira de potencializar a atividade antibacteriana individual desses compostos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2001. 456 p.

AL-BAYATI, F. A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 116, n. 3, p. 403-406, Mar. 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Hanover: EPS Group, 1992. 1208 p.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BOSSOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. 2. ed. Boston: Jones and Bartlett, 1998. 670 p.

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.

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

CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G.; ADRIÃO, A.; FALEIRO, L.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C.; ANDREW, P. W.; TENREIRO, R. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial–temporal mapping along production cycle. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 1, p. 52-63, May 2007.

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

CHASSEIGNAUX, E.; GERAULT, P.; TOQUIN, M.; SALVAT, G.; COLIN, P.; ERMEL, G. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 210, n. 2, p. 271-275, May 2002.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm formation and control in food processing facilities. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. M.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. E. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1696, June 2008.

CRISTANI, M.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; GRAZIA SARPIETRO, M.; MICIELI, D.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, June 2007.

CRUZ, C. D.; SILVESTRE, F. A.; KINOSHITA, E. M.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 375-383, June 2008.

DANTAS, A. A. A. do; CARVALHO, L. G. D.; FERREIRA, E. Classificação e tendências climáticas em Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1862-1866, nov./dez. 2007.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. New York: ASM, 1997. p. 520-556.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 1/2, p. 101-109, Mar. 2002.

DENYER, S. P.; HUGO, W. B. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: _____. **Mechanisms of action of chemical biocides**. Oxford: Oxford Blackwell Scientific, 1991. p. 171-188. (The society for applied bacteriology, technical series, 27).

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Feb. 2000.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**.- Sistema de análise de variância para dados balanceados: programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos Versão 4.6. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Software.
.

FU, Y. J.; ZU, Y. G.; CHEN, L. Y.; SHI, X. G.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, Sussex, v. 21, n. 10 , p. 989-994, June 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-15, Jan. 2007.

GIBSON, H.; TAYLOR, J. H.; HALL, K. E.; HOLAH, J. T. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 41-49, July 1999.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; NG, Y. Y.; GYMOESE, P.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 1165-1171, Oct. 2007.

GUIMARÃES, L. G. de L.; CARDOSO, M. das G.; ZACARONI, L. M.; LIMA, R. K. de; PIMENTEL, F. A.; MORAIS, A. R. de. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; WYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on

Escherichia coli. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

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

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

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S.; MURRAY, D. B.; NAIDU, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 2, p. 797-803, Feb. 2005.

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

LÓPEZ, V.; VILLATORO, D.; ORTIZ, S.; LÓPEZ, P.; NAVAS, J.; DÁVILA, J. C.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V. Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. **Meat Science**, Barking, v. 78, n. 1/2, p. 130-134, Jan./Feb. 2008.

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

ORTIZ, R. S.; MARRERO, G. V.; NAVARRO A. L. T. Instructivo técnico para el cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 7, n. 2, p. 89-95, 2002.

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

PAN, Y.; BREIDT JUNIOR, F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing

environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7711-7717, Dec. 2006.

ROLLER, S. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on a European research project. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v. 36, n. 3/4, p. 333-345, Oct. 1995.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypoclorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 81-85, Oct. 2000.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 1070-1075, Nov. 2008.

SCHAFFER, C.; MESSNER, P. The structure of secondary cell wall polymers: how gram-positive bacteria stick their cell walls together. **Microbiology**, London, v. 151, n. 3, p. 643-651, Mar. 2005.

SENCZEK, D.; STEPHAN, R.; UNTERMANN, F. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 155-159, Dec. 2000.

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

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M. de; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, June 1995.

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

SMOOT, L. M.; PIERSON, M. D. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 10, p. 1293-1298, Oct. 1998.

TORRES, K.; SIERRA, S.; POUTOU, R.; CARRASCAL, A.; MERCADO, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes,* microorganismo zoonótico emergente. **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v. 10, n. 1, p. 511-543, 2005.

ULTEE, A.; KETS, E. P.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, Oct. 1999.

UNIVESITY OF HAWAII. Botany Department. **Poaceae (*Gramineae*)**. Disponível em: <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/po.htm>. Acesso em: 25 nov. 2008.

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

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

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2765-2770, Oct. 1998.

ANEXOS

ANEXO A **Página**

TABELA 1A Resumo da análise de variância para o diâmetro dos halos de inibição, em milímetros (mm), em função dos tratamentos estudados..... 150

TABELA 2A Resumo da análise de variância para o número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas aos cupons de aço inoxidável às 3 horas, transformado por Log (x), em função dos tratamentos estudados..... 150

TABELA 3A Resumo da análise de variância para o número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas aos cupons de aço inoxidável às 240 horas, transformado por Log (x), em função dos tratamentos estudados..... 151

ANEXO A

TABELA 1A Resumo da análise de variância para o diâmetro dos halos de inibição, em milímetros (mm), em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	QM
Óleos essenciais (OE)	2	5,367870 **
Concentrações (C)	8	34,251944 **
OE x C	16	1,027731 **
Erro	54	0,252963
Total corrigido	80	
CV (%) = 26,17		
Média Geral: 1,9222222		

** Significativo, pelo teste de F, a 1% de probabilidade.

TABELA 2A Resumo da análise de variância para o número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas aos cupons de aço inoxidável às 3 horas, transformado por Log (x), em função dos tratamentos estudados.

FV	GL	QM
Sanificantes (S)	3	10,386841 **
Tempos de contato (TC)	1	8,320135 **
S x TC	3	1,276308 ^{ns}
Blocos	2	58,753528 **
Erro	38	1,069168
Total corrigido	47	
CV (%) = 40,06		
Média geral: 2,5810120		

** Significativo, pelo teste de F, a 1% de probabilidade.

TABELA 3A Resumo da análise de variância para o número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas aos cupons de aço inoxidável às 240 horas, transformado por Log (x), em função dos tratamentos estudados.

FV	**GL**	**QM**
Sanificantes (S)	3	33,525984 **
Tempos de contato (TC)	1	27,912882 **
S x TC	3	2,232164 ^{ns}
Blocos	2	34,590538 **
Erro	38	2,290230
Total corrigido	47	
CV (%) = 58,59		
Média geral: 2,5696162		

** Significativo, pelo teste de F, a 1% de probabilidade.

ANEXO B **Página**

TABELA 1B Equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação (R^2) para o diâmetro médio dos halos de inibição, formado em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais (OE) de *Cymbopogon citratus* (CC), *Cymbopogon nardus* (CN) e sua combinação (CM), frente a *Listeria monocytogenes*..... 153

FIGURA 1B Diâmetro médio dos halos de inibição formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (CC), *Cymbopogon nardus* (CN) e sua combinação (CM), frente a *Listeria monocytogenes*..... 154

TABELA 1B Equações de regressão ajustadas e coeficientes de determinação (R^2) para o diâmetro médio dos halos de inibição, formado em função das diferentes concetrações dos óleos essenciais (OE) de *Cymbopogon citratus* (CC), *Cymbopogon nardus* (CN) e sua combinação (CM), frente a *Listeria monocytogenes.*

OE	Equações de regressão	R^2
CC	$-0,250888+0,104761x-0,001070x^2+0,000004x^3-0,00000x^4$	0,9830
CN	$-0,172097+0,039988x-0,000154x^2+0,00000x^3$	0,9768
CM	$-0,192290+0,082862x-0,0007600x^2+0,000003x^3-0,00000x^4$	0,9909

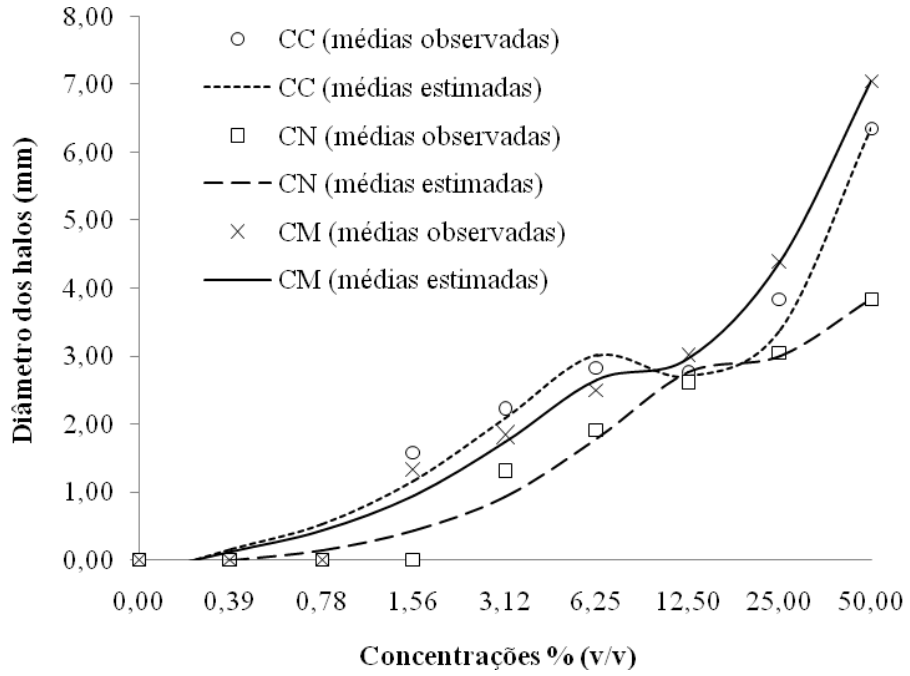


FIGURA 1B Diâmetro médio dos halos de inibição, formados em função das diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (CC), *Cymbopogon nardus* (CN) e sua combinação (CM), frente a *Listeria monocytogenes*.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo