

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Efeito de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* em biofilmes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em cupons de aço inoxidável”

GABRIELA SATTI LAMEU

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

GABRIELA SATTI LAMEU

“Efeito de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* em biofilmes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em cupons de aço inoxidável”

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Biologia Geral

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Cristina Pereira De Martinis

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lameu, Gabriela Satti.

“Efeito de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* em biofilmes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em cupons de aço inoxidável”. Ribeirão Preto, 2014.

100p: il; 30 cm

Monografia, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Geral.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Cristina Pereira De Martinis

1. *Salmonella* Enteritidis 2. Biofilme 3. Óleos essenciais 4. Inibição

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP

Dedico este texto aos meus pais Eliana e Luiz Roberto, e aos meus irmãos Filipe e Juliana, por toda compreensão, amor e suporte durante os quatro anos de minha graduação.

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e por todas as graças alcançadas.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elaine Cristina Pereira De Martinis, pela generosidade e paciência ao me ensinar e orientar, e por acreditar em meu potencial.

À Dr.^a Fernanda Barbosa dos Reis-Teixeira, meu braço direito, por estar, por acreditar e por ser.

À técnica do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), Vanessa Maciel de Souza, por tudo o que me ensinou não somente sobre a pesquisa, mas também sobre a vida.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Fabrício, Lilian, Natália, Nelly, Marina, Patrícia, Paula, Luiz, Lucas, Ana e Lizziane, pelas risadas e bons momentos e também pelas contribuições ao projeto.

À Prof.^a Dr.^a Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e à MSc. Ingrid Pontes de Souza, pelo fornecimento dos óleos essenciais utilizados no projeto.

À técnica Isabel Cristina Casanova Turatti do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPND), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob responsabilidade do Prof.^o Dr.^o Norberto Peporine Lopes, pela realização da cromatografia gasosa.

À Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), pela presteza e atenção sempre que necessitei.

Aos meus professores da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, que de diferentes maneiras contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP), e também aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), por todos os serviços prestados e também pelo agradável convívio.

Aos meus colegas da 48^o turma de Ciências Biológicas da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por terem compartilhado bons e maus momentos ao meu lado, por terem me aceitado, e por tornarem esses quatro anos muito mais prazerosos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de iniciação científica (Processo nº 2013/01069-4 e Processo nº 2014/09364-8).

Aos meus pais Luiz e Eliana, por todo o suporte material e principalmente afetivo desde os meus primeiros anos escolares, respeitando minhas escolhas e vibrando com cada pequena conquista, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos Filipe e Juliana, meu referencial de profissionais dedicados, honestos e competentes.

Aos meus avós, tios e primos por todo apoio ao longo desta caminhada.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não devemos ter medo dos confrontos...
até os planetas se chocam e do caos nascem as estrelas.”*

Charles Chaplin

RESUMO

LAMEU, G. S. “Efeito de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* em biofilmes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis em cupons de aço inoxidável”. 2014, 100f. Monografia – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O aparecimento de patógenos alimentares resistentes aos compostos antimicrobianos convencionais tem estimulado a busca por estratégias alternativas para controle de biofilmes. Nesse sentido, muitos estudos vêm testando a ação antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de plantas contra esses patógenos. No presente trabalho inicialmente foram realizados experimentos para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) do antibiótico polimixina B. Este composto foi utilizado como controle negativo de crescimento nos experimentos para determinação da CIM e CBM dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Illicium verum* (anis estrelado), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto), frente à cultura de *Salmonella* Enteritidis. Para determinação da CIM e CBM do controle e dos óleos essenciais foi utilizado o método de microdiluição, com caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) em microplacas de poliestireno de 96 poços. Na segunda etapa, a partir dos resultados da CIM e CBM determinadas em caldo para cada óleo essencial, foi testado o potencial inibitório dos óleos essenciais em biofilmes de *Salmonella* Enteritidis com quatro dias de incubação, formados em cupons de aço inoxidável. Após os tratamentos, os cupons foram corados com iodeto de propídio e SYTO9 para avaliação da viabilidade das células remanescentes nos biofilmes, e observados em microscópio de fluorescência. As soluções dos óleos de *C. citratus*, *Z. officinale* e *E. globulus* a 4% (v/v) apresentaram efeito inibitório em biofilmes de *Salmonella*, demonstrado por enumeração das células aderidas por semeadura em placas de ágar BHI. Entretanto, a análise por microscopia de fluorescência detectou a presença de células viáveis nas superfícies abióticas tratadas com os óleos essenciais, apontando a necessidade de mais estudos para garantia da eficácia destes agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: *Salmonella*; células planctônicas; células sésseis; antimicrobianos.

ABSTRACT

LAMEU, G. S. “Effect of essential oils of *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* and *Eucalyptus globulus* in biofilms of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis on stainless steel coupons”. 2014. 100f. Monograph - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The emergence of resistant foodborne pathogens to conventional antimicrobial compounds has stimulated the search for alternative strategies to control biofilms. In this sense, many studies have been tested the antimicrobial action of essential oils obtained from plants against these pathogens. During this work, initially experiments were performed for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the antibiotic polymyxin B. This compound was used as a negative control in the experiments to determine the MIC and the MBC of the essential oils of *Cymbopogon citratus* (lemongrass), *Illicium verum* (star anise), *Zingiber officinale* (ginger) and *Eucalyptus globulus* (eucalyptus), against the culture of *Salmonella* Enteritidis. To determine the MIC and MBC of the essential oils and control, the microdilution method was used, with Brain Heart Infusion broth (BHI) on 96 wells microplate. Based on MIC and MBC determined in broth, each essential oil was tested for the inhibitory potential in biofilms of *Salmonella* Enteritidis, along four days of incubation, on stainless steel coupons. After the treatments, the coupons were stained (iodide propidium and SYTO9) for evaluation of the viability of remaining cells in biofilms and observed under fluorescence microscopy. The solutions of *C. citratus*, *E. globulus* and *Z. officinale*, at the concentration 4% (v/v) showed an inhibitory effect on biofilms of *Salmonella*, as demonstrated by enumeration of adhered cells on agar BHI. However, fluorescence microscopy by dyes of cell viability detected the presence of viable cells on abiotic surfaces treated with the essential oils, indicating a need for further studies to guarantee the efficacy of these antimicrobial agents.

Keywords: *Salmonella*; planktonic cells; sessile cells; antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das etapas de formação do biofilme bacteriano.....5
- Figura 2.** Foto colorida de microscopia eletrônica de varredura de *S. enterica*.....7
- Figura 3.** Número de surtos alimentares no Brasil durante os anos 2000 - 2013, de acordo com o agente etiológico. Modificado de Ministério da Saúde, (BRASIL,2013).....8
- Figura 4.** Ilustração da metodologia seguida para construção da curva de crescimento de *Salmonella* Enteritidis.....22
- Figura 5.** Fluxograma seguido para a obtenção dos óleos essenciais utilizados neste projeto.....24
- Figura 6.** Representação esquemática da metodologia para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais.....25
- Figura 7.** Representação esquemática da metodologia utilizada para os estudos de formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis em superfície de aço inoxidável.....29
- Figura 8.** Representação esquemática da metodologia utilizada para o estudo da inibição da formação de biofilme pelos óleos essenciais.....31
- Figura 9.** Curva de crescimento de *Salmonella* Enteritidis obtida com a leitura da absorbância em 600 nm, em caldo BHI, na temperatura de 37°C, de acordo com os dados da tabela 3.....37
- Figura 10.** Populações de *S. Enteritidis* (expressas em log de UFC/cm²) aderidas a cupons circulares de aço inoxidável após quatro dias de incubação (25°C) e tratamento por 1 hora com PBS (grupo controle), ou soluções a 4% (v/v) dos óleos essenciais de *E. globulus* (eucalipto), *C. citratus* (capim-limão) e *Z. officinale* (gengibre).....41
- Figura 11.** Imagens da microscopia de fluorescência dos cupons de aço inoxidável mostrando as células viáveis em verde e células mortas em vermelho. As imagens foram adquiridas com o uso da ocular de 10x e objetiva de 20x. Escala 20 µm.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição dos controles utilizados nos ensaios para determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais frente a células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	26
Tabela 2.	Composição dos controles utilizados nos experimentos para determinação da CIM e da CBM do antibiótico polimixina B frente a células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	27
Tabela 3.	Densidades ópticas (DO) a 600 nm e populações (P) de <i>Salmonella</i> Enteritidis enumeradas em placas de ágar BHI em diferentes tempos de incubação a 37°C em duplicatas (DO 1 e P 1, DO 2 e P 2).....	36
Tabela 4.	Resultados das duplicatas realizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de óleos essenciais frente a células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	38
Tabela 5.	Resultados das duplicatas realizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da polimixina B frente a células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	39
Tabela 6.	Populações de <i>Salmonella</i> Enteritidis em biofilmes formados em cupons de aço inoxidável, enumeradas em placas de ágar BHI pela técnica <i>drop plate</i> (UFC/cm ²). Foram avaliados os grupos sem tratamento e grupos com tratamento com os óleos de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Zingiber officinale</i> e <i>Eucalyptus globulus</i>	40
Tabela 7.	Composição química (%) dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> , <i>Z. officinale</i> e <i>E. globulus</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração, do inglês <i>“Brain Heart Infusion”</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês <i>“Centers for Disease Control and Prevention”</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doença transmitida por alimentos
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares, do inglês <i>“Extracellular polymeric substances”</i>
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos – EUA, do inglês <i>“Food and Drug Administration”</i>
FSA	Agência de Normas Alimentares – RU, do inglês <i>“Food Standards Agency”</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IR	Índice de retenção
IS	Índice de similaridade
ND	Não determinado
OE	Óleo essencial
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada, do inglês <i>“Phosphate buffered saline”</i>
TSB	Caldo Triptona de Soja, do inglês <i>“Tryptic Soy Broth”</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

WHO Organização Mundial de Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

LISTA DE SÍMBOLOS

% (v/v)	Porcentagem volume por volume
°C	Graus Celsius
cm ²	Centímetros quadrados
eV	Elétron-volts
g	Gramas
kHz	Quilohertz
mg	Miligramas
ml	Mililitros
ml.min ⁻¹	Mililitros por minuto
mm	Milímetros
m/z	Razão massa/carga
nm	Nanômetros
rpm	Rotações por minuto
µg	Microgramas
µl	Microlitros

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiv
1. Introdução.....	2
1.1 Biofilmes.....	3
1.2 <i>Salmonella</i> sp.....	6
1.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	9
1.4 Formas de prevenção da formação e controle de biofilmes.....	11
1.5 Óleos essenciais de <i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Illicium verum</i> , <i>Zingiber officinale</i> e <i>Eucalyptus globulus</i>	14
2. Objetivos.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. Material e Métodos.....	21
3.1 Cultura bacteriana.....	21
3.2 Curva de crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis para determinação do inóculo ajustado.....	21
3.3 Óleos essenciais: obtenção, determinação da CIM e CBM, e padronização do controle negativo de crescimento.....	23
3.4 Formação do biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis em superfície de aço inoxidável.....	28

3.5 Inibição da formação do biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis pelos óleos essenciais.....	29
3.6 Microscopia de fluorescência.....	31
3.7 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	32
3.8 Análise estatística.....	33
4. Resultados.....	35
4.1 Curva de crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis para determinação do inóculo ajustado.....	35
4.2 CIM e CBM dos óleos essenciais.....	37
4.3 CIM e CBM da polimixina B.....	38
4.4 Inibição da formação de biofilme de <i>Salmonella</i> Enteritidis pelos óleos essenciais.....	39
4.5 Análise por microscopia de fluorescência.....	41
4.6 Constituintes dos óleos essenciais.....	43
5. Discussão.....	45
5.1 Curva de crescimento e CIM e CBM da polimixina B.....	45
5.2 CIM e CBM da polimixina B.....	45
5.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis e óleos essenciais.....	46
5.3.1 Avaliação dos resultados.....	46
5.3.2 Mecanismos de ação.....	51
5.3.3 Determinação de viabilidade celular.....	51
6. Considerações finais.....	54
7. Referências Bibliográficas.....	56

Anexo

Apêndice

1. Introdução

Doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, parasitas e fungos podem ser disseminadas, direta ou indiretamente, de uma pessoa para outra (WHO, 2014). Além disso, muitos patógenos podem contaminar alimentos e água, tornando estes elementos importantes veículos de dispersão de micro-organismos, despertando a atenção e vigilância constante dos órgãos de inspeção sanitária (CDC, 2012).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) são causadas por agentes que penetram no organismo humano através da ingestão de água ou alimentos contaminados incluindo plantas tóxicas, micotoxinas, contaminantes químicos como os pesticidas e metais tóxicos, e contaminantes biológicos, como os micro-organismos patogênicos, sendo estes a maior causa das enfermidades (NOTERMANS & VERDEGAAL, 1992; AMSON *et al.*, 2006).

Segundo o CDC (2012), mais de 250 doenças de origem alimentar têm sido descritas, e há 31 patógenos conhecidos nos Estados Unidos que podem contaminar alimentos causando doenças, sendo muitos desses patógenos monitorados por sistemas de saúde pública. Alimentos contaminados estão frequentemente envolvidos em doenças diarreicas, e estima-se que levem a óbito até 22 milhões de pessoas por ano, das quais 1,9 milhões são crianças (WHO, 2012; SEGOVIA *et al.*, 2014).

Além de ser um problema proeminente de saúde pública, a segurança e qualidade dos produtos alimentares tornaram-se também uma questão econômica de grande relevância (SEGOVIA *et al.*, 2014). Somente para a economia norte-americana o custo anual estimado de incidentes de segurança alimentar é de 7 bilhões de dólares, provenientes de notificações aos consumidores, retirada de lotes contaminados das prateleiras, além do pagamento de danos referentes à ações judiciais. Outros prejuízos incluem ainda a perda de mercados, queda na demanda de consumo, litígios e fechamento de empresas (HUSSAIN & DAWSON, 2013). Alguns danos também podem ocorrer em equipamentos como superfícies metálicas presentes em tanques e dutos de indústrias de alimentos, em virtude de corrosões geradas por reações químicas e biológicas causadas por micro-organismos agregados a essas superfícies. Se esses micro-organismos aderidos formarem uma camada suficientemente espessa em trocadores de calor de placas e dutos, eles

podem inclusive reduzir a eficácia da transferência de calor (VIEIRA *et al.* 1993; MITTELMAN, 1998; SIMÕES *et al.*, 2010).

De acordo com relato de Bergamini *et al.* (2013) baseado em dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, houve entre os anos de 2000 e 2011, 8663 surtos de doenças veiculadas a alimentos, com 163425 enfermos e 112 óbitos. Entretanto, o perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido, possivelmente porque muitos casos de enfermidades transmitidas por alimentos não são notificados, pois seus sintomas são geralmente similares aos de gripes comuns ou discretas diarreias (AMSON *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2013).

Patógenos capazes de causar surtos alimentares podem ser encontrados em vários locais, e durante qualquer etapa do processamento dos alimentos. Segundo Nguyen & Yuk (2013), a capacidade desses micro-organismos de fixarem-se e subsequentemente desagregarem-se a partir de superfícies permite sua sobrevivência no ambiente natural, pelo controle de seu ambiente nutricional e proteção contra estresses ambientais. Dentre as características microbianas que permitem aos micro-organismos ajustarem suas necessidades permitindo a sobrevivência em diversos locais, uma das mais importantes é a habilidade destes organismos formarem biofilmes (WINKELSTRÖTER *et al.*, 2013).

1.1 Biofilmes

Biofilmes começaram a ser descritos na literatura há mais de 70 anos (Zobell, 1943), e podem ser definidos como comunidades sésseis de micro-organismos caracterizadas por células que se aderem a um substrato ou superfície, permanecendo embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) produzida pelas próprias células (GIAOURIS *et al.*, 2014). Enquanto oferece um grande problema para a manutenção da qualidade e segurança alimentar em indústrias, a formação de biofilme claramente provê às células numerosas vantagens, dentre elas, a proteção contra condições nocivas e estressantes, proporcionando certo grau de homeostase, a diminuição da competição por nutrientes disponíveis em determinada área, benefícios devido a interações metabólicas entre espécies microbianas (comensalismos, cooperação e

mutualismo), e transferências gênicas capazes de originar novos caracteres fenotípicos mais adaptativos ao ambiente local (DAVEY & O'TOOLE, 2000; MOLIN & TOLKER-NIELSEN, 2003; GIAOURIS *et al.*, 2014).

A adesão e subsequente formação do biofilme dependem de alguns fatores como espécies bacterianas envolvidas, características intrínsecas dessas células e seus produtos gênicos, características da superfície de adesão, propriedades do meio circundante, e fatores ambientais tais como disponibilidade de água e nutrientes, pH e temperatura, dentre outros (GIBSON *et al.*, 1999; DUNNE, 2002; BROOKS & FLINT, 2008; PARK *et al.*, 2012; GIAOURIS *et al.*, 2014). O desenvolvimento de biofilmes pode ocorrer em quase todo tipo de superfície, e em qualquer ambiente onde micro-organismos estejam presentes, sendo sua formação um processo dinâmico que envolve uma série de etapas (figura 1). Em um ambiente de processamento de alimentos, bactérias sob a forma de células planctônicas livres juntamente com moléculas orgânicas e inorgânicas, podem ser transportadas por difusão ou por fluxo em líquido, e adsorver a superfície (fase I). Esse acúmulo de moléculas na interface sólido-líquido gera um aumento na concentração de nutrientes disponíveis, em comparação à fase líquida. Conseqüentemente, a maior disponibilidade de nutrientes favorece o desenvolvimento de biofilmes (KUMAR *et al.*, 1998).

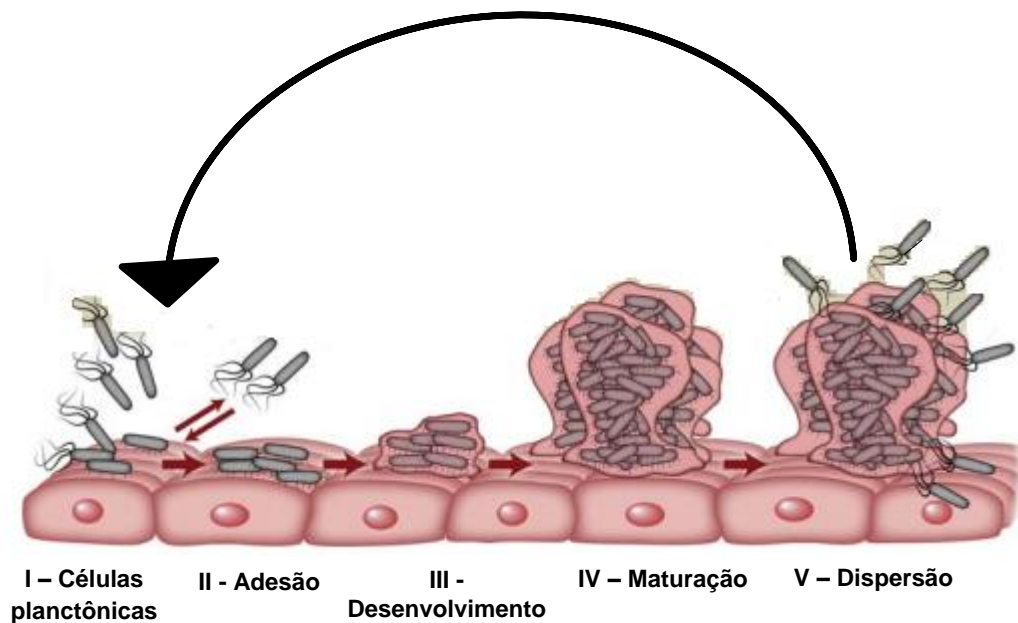


Figura 1. Representação esquemática das etapas de formação do biofilme bacteriano. I – Células planctônicas; II – Adesão à superfície; III - Início do desenvolvimento do biofilme: produção da matriz de exopolissacarídeos; IV – Maturação do biofilme; V – Dispersão das células do biofilme. Modificado de Kostakioti *et al.*, 2013.

A fase II da formação de um biofilme é a adesão dos micro-organismos à superfície. Esse processo pode ser ativo ou passivo, dependendo da motilidade bacteriana ou do transporte de células planctônicas pela ação gravitacional, difusão ou forças dinâmicas dos fluidos. No início, as interações entre as células bacterianas e o substrato permitem uma adesão de caráter reversível, e posteriormente ocorre a adesão irreversível, através da produção de exopolissacarídeos que complexam com a superfície onde o biofilme está se estabelecendo e/ou com receptores específicos localizados em fímbrias da superfície celular bacteriana. A partir desse estágio são requeridas forças muito maiores para a remoção dos biofilmes (KUMAR *et al.*, 1998; DUNNE, 2002).

Após a adesão irreversível (fase II), tem início o processo de desenvolvimento e maturação do biofilme associado à produção adicional de exopolissacarídeos (fases III e IV). A densidade e complexidade do biofilme aumentam, e os micro-organismos aderidos à superfície começam a se replicar e morrer, enquanto os produtos extracelulares gerados interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente próximo formando a glicocálice (KUMAR *et al.*, 1998; DUNNE, 2002). A fase de dispersão (fase V) começa quando o biofilme atinge uma massa crítica e um equilíbrio dinâmico é alcançado, com o desprendimento de micro-organismos planctônicos livres a partir da camada mais externa, com potencial para colonizar outras superfícies (DUNNE, 2002).

Os atributos estruturais e fisiológicos dos biofilmes conferem aos micro-organismos maior tolerância aos agentes antimicrobianos sejam estes antibióticos, desinfetantes ou germicidas. Os mecanismos responsáveis por essa resistência podem ser a diminuição da penetração dos agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme, a alteração das taxas de crescimento dos micro-organismos e mudanças fisiológicas relacionadas ao modo de crescimento do biofilme. A matriz polimérica extracelular produzida pelas células do biofilme pode atuar como uma barreira de difusão para moléculas antimicrobianas, influenciando a taxa de transporte destas para o interior do biofilme (DONLAN & COSTERTON, 2002; STEWART & FRANKLIN, 2008).

Outra hipótese para explicar a resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos é o fato de que a taxa de crescimento dessas células seria menor se comparada a taxa de células planctônicas resultando em uma ação antimicrobiana mais lenta (DONLAN & COSTERTON, 2002). Mudanças fisiológicas devido ao modo de crescimento do biofilme também podem ocasionar a maior resistência a antimicrobianos como, por exemplo, algumas bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* respondem à limitação de nutrientes e outros estresses ambientais sintetizando fatores sigma capazes de regular a transcrição de genes cujos produtos podem mitigar os efeitos do estresse.

Há muitos estudos relatando a formação de biofilmes por patógenos de origem alimentar tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* sp., entre outros (HOOD e ZOTTOLA, 1997; CHAE & SCHRAFT, 2000; XU *et al.*, 2010; PARK *et al.*, 2012).

1.2 *Salmonella* sp.

Salmonella sp. são micro-organismos pertencentes a família *Enterobacteriaceae* e ao grupo *Salmonellae* (FDA, 2013). Essas bactérias têm forma de bastonetes (bacilos), são Gram negativas, flageladas, não esporuladas e anaeróbicas facultativas (YANG *et al.*, 2012; FDA, 2013) (Figura 2). Segundo Schultz (2008) esses micro-organismos foram isolados pela primeira vez entre 1884-1886 pelo microbiologista Theobald Smith do Departamento de Agricultura da

Agência de Indústria Animal em Washington DC, Estados Unidos. Smith acreditava que essas bactérias eram causadoras da cólera suína. Mais tarde, foi demonstrado que a cólera suína era uma infecção viral, enquanto o bacilo de Smith era, na verdade, um invasor secundário. Embora essas bactérias tenham sido isoladas por Smith, seu chefe Daniel E. Salmon reivindicou o crédito pela descoberta, e o gênero acabou sendo nomeado em sua homenagem.

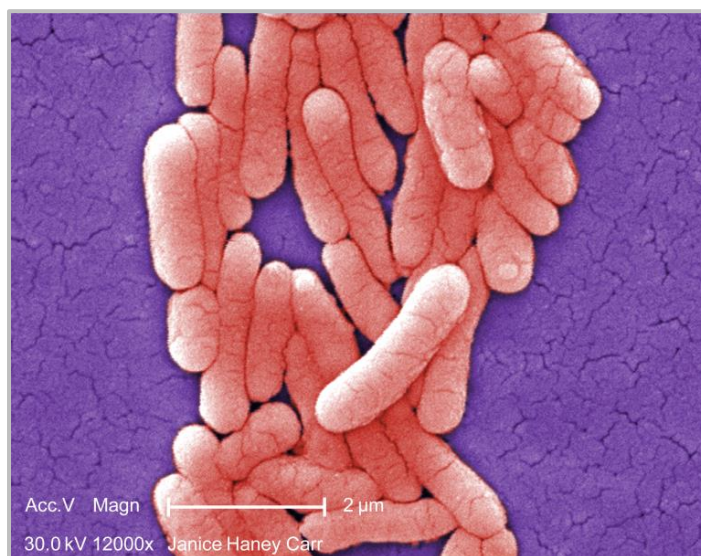


Figura 2. Foto colorida de microscopia eletrônica de varredura de *S. enterica*. (Imagem retirada da Biblioteca de Imagens do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, CDC/Dr. Ray Butler, créditos a Janice Haney Carr, domínio público).

De acordo com a taxonomia moderna, o gênero *Salmonella* possui somente duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, no entanto, *S. enterica* compreende mais de 2500 sorotipos (ANDREWS-POLYMENIS *et al.*, 2010). Alguns sorotipos de *S. enterica*, tais como *S. Typhimurium* causam gastroenterites, enquanto outros, tais como *S. Typhi* causam infecções sistêmicas e febre tifoide (MCCLELLAND *et al.*, 2001; FDA, 2013). A febre tifoide é uma grave e invasiva doença bacteriana com uma incidência global anual de aproximadamente 16 milhões de casos, ocasionando 160 mil mortes (PARKHILL *et al.*, 2001; FDA, 2012).

Segundo o CDC (2012), espécies de *Salmonella* não tifoide são o segundo grupo de patógenos que mais contribuem para doenças de origem alimentar adquiridas domesticamente, e são o primeiro grupo entre os patógenos que mais contribuem para doenças de origem alimentar adquiridas domesticamente e que resultam em hospitalização e morte (CDC, 2012).

Surtos de origem alimentar devido a *Salmonella enterica* estão ligados a áreas de processamento contaminadas, como equipamentos e superfícies de manipulação dos alimentos. Por isso, a formação de biofilmes no ambiente de processamentos de alimentos vem sendo fonte de muitos estudos, e há relatos que biofilmes de *Salmonella* podem permanecer em superfícies por até 10 anos (CORCORAN *et al.*, 2013; RUSSO *et al.*, 2013).

De acordo com Toboldt *et al.* (2014) o principal reservatório de *Salmonella enterica* é o trato intestinal de muitas espécies de animais, e esses micro-organismos podem ser isolados a partir de produtos de origem animal como carne bovina, leite e ovos. Segundo esses autores, em 2011 um total de 95548 casos de salmonelose foram confirmados na União Europeia, e dados atualizados do Ministério da Saúde (Brasil, 2013) apontam *Salmonella* sp. como responsável pelo maior número de surtos identificados entre os anos 2000 à 2013, com 1552 casos registrados (Figura 3).

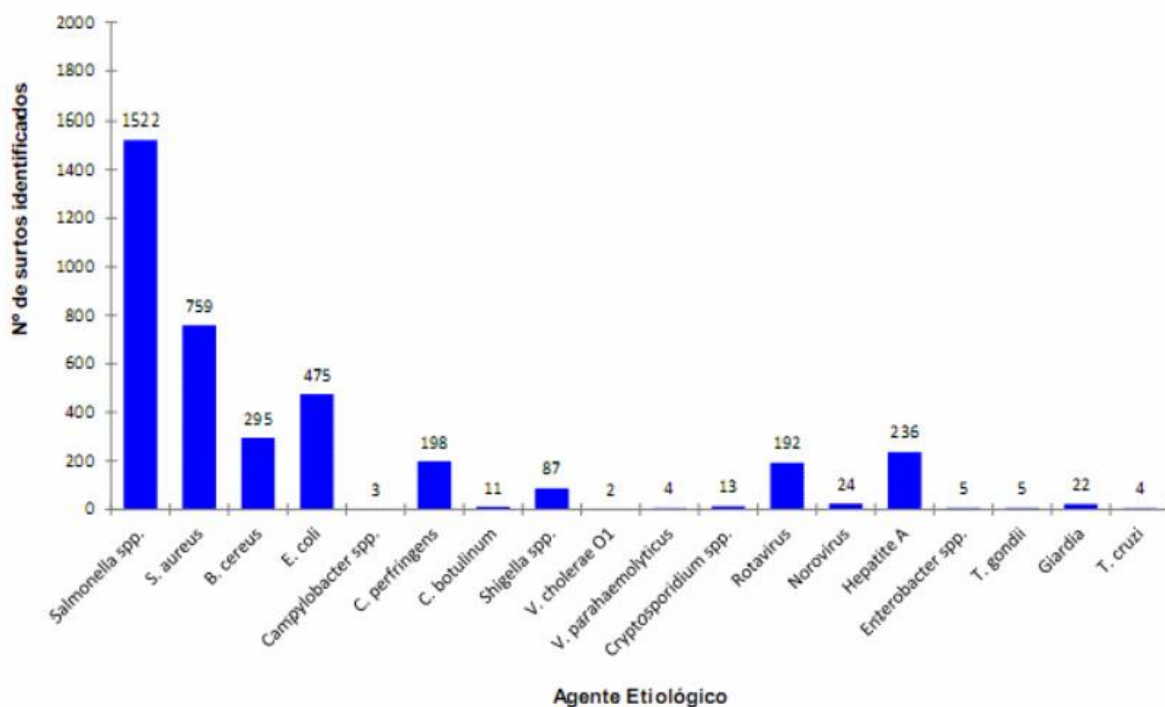


Figura 3. Número de surtos alimentares no Brasil durante os anos 2000 - 2013, de acordo com o agente etiológico. Modificado de Ministério da Saúde (BRASIL, 2013).

Nas gastroenterites causadas por *Salmonella* sp. veiculada por alimentos, os sintomas geralmente aparecem após 12 – 14 horas da ingestão. Os sintomas persistem por 2-3 dias e consistem de náuseas, vômito, dores abdominais, dores de

cabeça, calafrios e diarreias. Esses sintomas em geral são acompanhados de debilidade, fraqueza muscular, febre moderada e sonolência. A taxa de mortalidade média é de 4,1%, variando de 5,8% durante o primeiro ano de vida, para 2% entre o primeiro e o 50º ano, e 15% em pessoas acima de 50 anos. Em alguns casos, *Salmonella* pode deixar o trato gastrintestinal chegando à corrente sanguínea, gerando um quadro de septicemia e infecção de outros tecidos, órgãos internos e/ou articulações, podendo se tornar uma doença crônica (JAY, 2005; FDA, 2012).

Segundo Jay (2005), embora esses micro-organismos na maior parte dos casos sejam eliminados do trato intestinal humano, até 5% dos pacientes se tornam portadores destes agentes patogênicos após a convalescença. Um número de células da ordem de 10^7 - 10^9 /g de alimento é geralmente o necessário para causar a salmonelose, entretanto, surtos de salmonelose podem ocorrer devido à presença de um número de células relativamente baixo, da ordem de 100 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/100 g de alimento, dependendo da heterogeneidade fisiológica dos indivíduos infectados, da composição do alimento contaminado e dos fatores de virulência das diferentes linhagens de bactéria (MONTEVILLE, 2012).

No Brasil, o padrão estabelecido para qualificação de *Salmonella* sp. em amostras de produtos alimentares é a ausência em 25 g, o mesmo padrão adotado para *Listeria monocytogenes* e outros patógenos. Assim, um produto ou lote será considerado impróprio para o consumo humano caso apresente tais micro-organismos patogênicos, que representam perigo severo a saúde do consumidor (BRASIL, 2001).

1.3 *Salmonella* Enteritidis

De acordo com Valeriano *et al.* (2012) *Salmonella* Enteritidis é um dos sorotipos mais prevalentes do gênero *Salmonella*, e infecções humanas em decorrência da contaminação de alimentos com este micro-organismo são preocupantes. Os fatores contribuintes e alimentos possivelmente envolvidos na transmissão de *S. Enteritidis* são refrigeração insuficiente ou manutenção de alimentos em temperaturas inadequadas (entre 5 e 60°C), cocção e reaquecimento inapropriados. Além disso, a contaminação pode ocorrer devido à contaminação

cruzada, falta de higiene e limpeza de equipamentos, por meio de manipuladores contaminados, e também a partir de carne bovina, suína, aves e seus produtos, e produtos a base de ovos crus (BRASIL, 2014).

S. Enteritidis foi epidemiologicamente associada com a contaminação de produtos avícolas devido ao contato com fezes de animais infectados (Borie *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2012) e, por esta razão, diferentes estratégias de controle de *S. Enteritidis* em criações de frangos de corte vêm sendo propostas (KIM *et al.*, 2007; LIM *et al.*, 2012). Em investigações epidemiológicas sobre *S. Enteritidis* foi relatado que este patógeno encontrou um nicho reservatório em ovos produzidos comercialmente e em frangos, a partir da colonização dos tratos intestinais e reprodutivos destes frangos (HUR *et al.*, 2012).

Por estas razões, antimicrobianos têm sido usados em zootecnia, inclusive em frangos, para tratar ou prevenir doenças e promover o crescimento (HUR *et al.*, 2012). Entretanto, o aparecimento de cepas de *S. Enteritidis* resistentes a agentes antimicrobianos têm aumentado a necessidade de novas estratégias eficazes no controle destes patógenos (LIM *et al.*, 2012). Por isso é importante monitorar a resistência de bactérias encontradas em alimentos e seus produtos alimentares (HUR *et al.*, 2012).

A FSA (2014) confirmou um surto recente de contaminação por *Salmonella* Enteritidis em ovos provenientes de uma fazenda na Espanha, o que afetou 262 pessoas na Inglaterra, País de Gales e Irlanda do Norte. Os ovos contaminados foram descartados ou tratados termicamente, e o caso foi relatado às autoridades espanholas que tomaram medidas imediatas para solucionar o problema, sacrificando os animais e posteriormente limpando e desinfetando o galpão.

Além de poderem estar presentes em ovos, frangos e outras fontes, cepas de *Salmonella* Enteritidis também podem colonizar diferentes superfícies inertes de contato com alimentos, formando biofilmes. Dentre estas superfícies, as de aço inoxidável têm sido muito utilizadas como superfícies de trabalho em indústrias de alimentos e pias de cozinha, devido à sua resistência mecânica, resistência à corrosão, longevidade e facilidade de fabricação (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Em indústrias de processamento de alimentos a maioria das superfícies é de aço inoxidável, incluindo dutos e tanques, máquinas e superfícies de trabalho. Além disso, o aço inoxidável é relativamente resistente ao ataque químico oxidante e a

agentes de higienização utilizados na indústria de alimentos, tais como hipoclorito, ácido peracético e iodóforos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

1.4 Formas de prevenção da formação e controle de biofilmes

A principal estratégia para prevenir a formação de biofilmes é limpar e sanitizar regularmente superfícies de trabalho, antes de uma possível adesão de bactérias a estas superfícies (Midelet & Carpentier, 2004; Simões *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2010), de modo que a eficiência com a qual essas operações serão realizadas afetará significativamente a segurança e a qualidade do produto final (SHARMA & ANAND, 2002; BREMER *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010).

A limpeza é o primeiro passo e de extrema importância para melhorar a sanitização do equipamento e superfícies de processamento (FORSYTHE & HAYES, 1998; SIMÕES *et al.*, 2010). É essencial remover os restos de alimentos e outros resíduos que possam conter micro-organismos ou promover seu crescimento. O uso de altas temperaturas pode diminuir a necessidade de aplicação de forças físicas, como jato de água ou fricção (MAUKONEN *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2010). Os produtos químicos normalmente utilizados como auxiliares na limpeza mecânica incluem os surfactantes ou produtos alcalinos, usados para suspender e dissolver resíduos de alimentos através da redução da tensão superficial, emulsificando ácidos graxos e gorduras e desnaturando proteínas (FORSYTHE & HAYES, 1998; MAUKONEN *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2010).

Os procedimentos de limpeza podem remover 90% ou mais dos micro-organismos associados à superfície, entretanto, não são capazes de matá-los, o que requer um procedimento de sanitização complementar à limpeza (GRAM *et al.*, 2007). O objetivo da sanitização é reduzir a população de células viáveis remanescentes encontradas nas superfícies de processamento de alimentos, após a limpeza, evitando o crescimento bacteriano antes do reinício da produção. Os sanitizantes devem ser eficazes, seguros e fáceis de utilizar, e não devem deixar resíduos tóxicos que possam afetar a saúde do consumidor e as propriedades sensoriais do produto final. No entanto, a literatura demonstra que não há uma estratégia com absoluta eficiência no controle de biofilmes (SIMÕES *et al.*, 2010).

Os produtos químicos usados atualmente em processos de sanitização são compostos ácidos, biocidas a base de aldeídos, produtos cáusticos, cloro, peróxido de hidrogênio, iodo, isotiazolinonas, ozônio, ácido peracético, compostos fenólicos, biguanidinas, halogênios surfactantes e compostos de amônio quaternário (ZOTTOLA *et al.*, 1994; WIRTANEN *et al.*, 2001; SIMÕES *et al.*, 2010; NILSSON *et al.*, 2011; WINKELSTRÖTER *et al.* 2014). Os compostos oxidantes, tais como ácido peracético, cloro, iodo e peróxido de hidrogênio são capazes de despolimerizar a matriz extracelular polimérica (EPS) facilitando a remoção de biofilmes (Chavant *et al.*, 2004) pelo rompimento de sua estrutura tridimensional complexa (COSTERTON *et al.*, 1995).

A emergência de bactérias resistentes a antimicrobianos convencionais demonstra claramente que são necessárias novas estratégias para controle de biofilmes (SIDHU *et al.*, 2001; SIMÕES *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2010). Assim, pesquisas por novas substâncias sanitizantes são importantes e promissoras. Entretanto, o recente posicionamento negativo dos consumidores frente a produtos químicos sintéticos, tem mudado o foco das pesquisas para o desenvolvimento de alternativas de fontes naturais (ROLLER, 1995; CHORIANOPOULOS *et al.*, 2008). No sentido de ampliar os princípios ativos disponíveis para o controle de micro-organismos em biofilmes, muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana de compostos naturais obtidos de plantas frente a patógenos alimentares (BURT, 2004).

Desde a Idade Média, óleos essenciais extraídos de plantas têm sido amplamente utilizados graças a suas propriedades bactericidas, antifúngicas, inseticidas, medicinais e cosméticas, e hoje em dia suas aplicações são especialmente utilizadas em indústrias de produtos de limpeza, farmacêuticas, cosméticas, na agricultura e em indústrias de alimentos (BAKKALI *et al.*, 2008). Óleos essenciais (OEs) são compostos complexos, aromáticos e voláteis, obtidos a partir de material vegetal. Esses óleos são metabólitos secundários normalmente sintetizados em células especiais ou em um grupo de células, encontradas em folhas e caules, cascas ou frutos (Oussalah *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2008), ou ainda em flores, brotos, sementes, madeira e raízes (BURT, 2004).

Aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, dentre os quais 300 são comercialmente importantes, podendo ser utilizados em perfumes, produtos de limpeza, maquiagem, uso odontológico, na agricultura, como conservantes e aditivos em alimentos, ou ainda como remédios naturais. Os óleos essenciais são geralmente obtidos por destilação por arraste a vapor ou por hidrodestilação, entretanto, há outros métodos que permitem sua obtenção e que devem ser escolhidos adequadamente de acordo com a finalidade da extração. Grande parte dos óleos essenciais comercializados são quimiotipados por cromatografia gasosa e análise em espectrometria de massas, para assegurar a qualidade destes óleos (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais podem conter entre 20 e 60 componentes, presentes em diferentes concentrações. Esses componentes podem ser classificados em dois grupos distintos, de acordo com sua origem biossintética (Betts, 2001; Pichersky *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008), sendo o maior grupo composto pelos terpenos e terpenoides e outro grupo com componentes aromáticos e alifáticos. Os óleos são caracterizados por dois ou três constituintes majoritários presentes em altas concentrações em comparação aos demais componentes. Em geral, os componentes majoritários determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI *et al.*, 2008).

Estudos recentes têm demonstrado as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais (Tassou & Nychas, 1995; Smith-Palmer *et al.*, 1998; Tassou *et al.*, 2000; Inouye *et al.*, 2001; Burt, 2004; Lanciotti *et al.*, 2004; Fisher & Philips, 2008), e muitos estudos *in vitro* relatam a alta eficiência de óleos essenciais contra bactérias patogênicas e deteriorantes (SMITH-PALMER *et al.*, 1998; HAMMER *et al.*, 1999; ELGAYYAR *et al.*, 2001; DORMAN & DEANS, 2000; GUTIERREZ *et al.*, 2008). Além da ação antimicrobiana destes compostos contra micro-organismos planctônicos, ao longo dos últimos anos esta ação também foi confirmada contra micro-organismos agregados em biofilmes (NIU & GILBERT, 2004; KNOWLES *et al.*, 2005; LEBERT *et al.*, 2007; CHORIANOPOULOS *et al.*, 2008; SCHILLACI *et al.*, 2008; KWIECINSKIA *et al.*, 2009; PEREZ-CONESA *et al.*, 2011; DESAI *et al.*, 2012; LAIRD *et al.*, 2012; NOSTRO *et al.*, 2012; JADHAV *et al.*, 2013; GIAOURIS *et al.*, 2014).

1.5 Óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus*

Cymbopogon é o gênero mais representativo da família *Poaceae*, que compreende cerca de 8000 espécies essencialmente herbáceas, e destaca-se pela sua capacidade de produzir óleo essencial, propriedade relativamente rara entre as gramíneas (ORTIZ *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2010). A espécie *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim-limão) é comumente utilizada na medicina popular para tratamento de distúrbios nervosos e gastrointestinais, e também como analgésica, anti-inflamatória, diurética e sedativa (SANTIN *et al.*, 2009; BASSOLÉ *et al.*, 2011). A composição do óleo de *C. citratus* obtido a partir de suas folhas já foi investigada por alguns autores, e seus componentes majoritários foram identificados como neral, geranial e mirceno (CHISOWA *et al.*, 1998; KASALI *et al.*, 2001; SACCHETTI *et al.*, 2005; OLIVERO-VERBEL *et al.*, 2010; BASSOLÉ *et al.*, 2011). A atividade inibitória do óleo essencial de *C. citratus* contra *Listeria monocytogenes* foi demonstrada *in vitro* por Oussalah *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2010) enquanto a efetividade antibiofilmes de *Salmonella* Enteritidis deste mesmo óleo essencial foi constatada pelos resultados obtidos por Valeriano *et al.* (2012).

Illicium verum Hook F., também conhecida como anis estrelado, é uma espécie da família *Illiciaceae* que produz um fruto perfumado e em formato de estrela, com muitas propriedades medicinais conhecidas (WANG *et al.*, 2011). Esse fruto tem sido utilizado pela tradicional medicina chinesa no tratamento de dores estomacais, êmeses, insônia, inflamações de pele e dores reumáticas (ITOGAWA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2011). O óleo essencial de anis estrelado pode ter uso tópico no tratamento do reumatismo e ainda como antisséptico (WANG *et al.*, 2011). O anis estrelado é também conhecido como uma especiaria, sendo comumente utilizado como aromatizante nas indústrias de alimentos, mas, os óleos essenciais obtidos a partir destes frutos têm sido o principal foco de pesquisas com espécies do gênero *Illicium*. De acordo com dados encontrados na literatura, o óleo essencial de anis estrelado contém primariamente (E)-anetol, estragol, limoneno, (Z)-anetol, pineno, β -felandreno e α -terpineol (Cu *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2011), e componentes isolados do óleo essencial, como (E)-anetol, demonstraram propriedades antifúngicas e antibacterianas (De *et al.*, 2012), tendo a fração de benzeno apresentado o maior

efeito inibitório frente aos micro-organismos testados (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*) (DE *et al.*, 2012).

Os rizomas secos de gengibre, nome popular da espécie *Zingiber officinale* Roscoe pertencente à família *Zingiberaceae*, são comercializados como especiaria e contém tanto componentes aromáticos quanto picantes. O óleo essencial extraído dos rizomas de gengibre é responsável por seu sabor característico e também pela pungência e, tanto o óleo essencial, quanto as oleorresinas obtidas a partir do rizoma têm sido utilizados em muitos alimentos, bebidas não alcoólicas, e muitos produtos farmacêuticos (SINGH *et al.*, 2008). Além disso, alguns compostos do gengibre são benéficos em certos casos de diarreia e náuseas. Ainda, produtos isolados do óleo essencial extraído do rizoma seco de gengibre demonstraram efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (HAZAN *et al.*, 2008). De acordo com Wolmuth *et al.* (2006) e Ali *et al.* (2008), mais de 50 componentes do óleo de gengibre já foram caracterizados e dentre estes, os principais são os monoterpenoides (geranial, neral, etc.) e os sesquiterpenoides (α -zingibereno, zingiberol, etc.). Debarma *et al.* (2013) relataram em seu trabalho que o óleo essencial de gengibre, em diferentes doses, teve efeito inibitório substancial contra todas as espécies e cepas bacterianas testadas, incluindo *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*. Outros estudos revelaram que o extrato metanólico obtido do rizoma de *Zingiber officinale* possuía atividade antibacteriana significativa contra *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus* (SUNILSON *et al.*, 2009; MESOMO *et al.*, 2013).

Eucalyptus globulus Labill. é uma espécie da família *Myrtaceae*, importante fonte de óleos essenciais com uma vasta gama de atividades biológicas como propriedades antibacterianas, antifúngicas, analgésicas e anti-inflamatórias (MULYANINGSIH *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2014). Esses óleos podem ser encontrados nas folhas de mais de 300 espécies do gênero *Eucalyptus*, sendo que cerca de 20 espécies já foram exploradas comercialmente para produção de óleos essenciais ricos em 1,8-cineol (ou eucaliptol), pelas indústrias farmacêuticas e cosméticas. As folhas de *E. globulus* contêm até 3,5% de óleo essencial, sendo o eucaliptol o principal constituinte encontrado em *Eucalyptus*. Entretanto, outros quimiotipos também são encontrados, como α -felandreno, p -cimeno, e γ -terpineno, dentre outros (OLAYINKA *et al.*, 2012). Muitos estudos têm demonstrado as

propriedades antibacterianas de espécies do gênero *Eucalyptus*, como *E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e *E. citriodora* contra um amplo espectro de microorganismos (CIMANGA *et al.*, 2002; ELAISSI *et al.*, 2011).

Dada a gama de possíveis aplicações dos óleos essenciais, seu potencial antimicrobiano e sua natureza pouco tóxica, a opção por seu uso para o controle ou inibição de bactérias patogênicas veiculadas em alimentos é uma boa estratégia e, com provável aceitação pelos consumidores, dentre as alternativas naturais vigentes para garantia da inocuidade de alimentos (BAJPAI *et al.*, 2012).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a eficiência de óleos essenciais para inibição de células planctônicas de *Salmonella* sp.
- Avaliar a eficiência de óleos essenciais para inibição de biofilmes de *Salmonella* sp. em superfície abiótica de aço inoxidável.

2.2 Objetivos específicos

- Construir a curva de crescimento de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis para conhecimento das fases de crescimento em função do tempo, a fim de padronizar condições para obtenção de inóculo ajustado com 10^5 UFC/ml.
- Definir um antibiótico para ser utilizado como controle negativo de crescimento em ensaios para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) desse antibiótico.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Illicium verum* (anis estrelado), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto), em meio de cultura inoculado com *Salmonella* Enteritidis.
- Formar biofilmes de *Salmonella* Enteritidis em cupons de aço inoxidável e, após quatro dias de incubação, avaliar a inibição destes biofilmes pré-formados por meio da imersão em soluções dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Illicium verum* (anis estrelado), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto), de acordo com os valores da CIM e CBM determinados anteriormente para células planctônicas.
- Realizar microscopia de fluorescência para identificar o estado fisiológico das células de *Salmonella* Enteritidis após tratamento do biofilme com as soluções dos óleos essenciais, por meio do tratamento dos cupons de aço inoxidável

com Kits de Viabilidade Bacteriana *LIVE/DEAD Backlight* que permite corar células viáveis e mortas simultaneamente.

- Identificar e quantificar os constituintes dos óleos essenciais que apresentaram atividade inibitória contra células planctônicas e sésseis de *Salmonella* Enteritidis, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, pela comparação dos tempos de retenção e do espectro de massas com os dados disponíveis nos bancos de dados do espectrômetro e da literatura.

3. Material e Métodos

3.1 Cultura bacteriana

Neste trabalho foi utilizada *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Enteritidis ATCC 13076 (doador pela FIOCRUZ, RJ, Brasil) que foi mantida congelada a -80°C em caldo Infusão Cérebro Coração, do inglês “*Brain Heart Infusion*” (BHI) (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 20% de glicerol (v/v) (Synth, Brasil).

3.2 Curva de Crescimento de *Salmonella* Enteritidis para determinação do inóculo ajustado

Para traçar a curva de crescimento da cultura de *Salmonella* Enteritidis foi adotada a metodologia de Assis (2007), com modificações, a fim de determinar o período correspondente ao final da fase de crescimento exponencial, a partir da qual seriam feitas as diluições para se obter o inóculo ajustado (10^5 UFC/ml), conforme desejado na etapa de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais e da polimixina B.

Foi preparado um tubo Falcon contendo 2 ml de glicerol e 8 ml de cultura reativada de *Salmonella* Enteritidis em caldo BHI a 37°C por 24 horas, e 0,75 ml do conteúdo deste tubo foi inoculado em um frasco erlenmeyer contendo 150 ml de caldo BHI, com a solução final a 0,5% (v/v). Essa solução foi distribuída em alíquotas de 5 ml entre 20 tubos de ensaio, e foi realizada incubação a 37°C . Foi realizada a leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu, Japão), e enumeração da população de *S. Enteritidis* em placas de Petri contendo ágar BHI (caldo BHI adicionado de 1,5% de ágar bacteriológico, da marca Oxoid). Esse procedimento foi realizado com todas as alíquotas a partir do tempo zero, a cada 15 minutos até 2 horas de incubação, e a cada hora (3 a 12 horas), e finalmente com 24 horas de incubação (Figura 4).

Para enumeração da população bacteriana, quando atingido o tempo de incubação determinado para cada alíquota, foi utilizado o método *drop plate* (HERIGSTAD, HAMILTON & HEERSINK, 2001, com modificações). Foram feitas

diluições decimais seriadas de 100 µl de cada alíquota em microtubos Eppendorf contendo 900 µl de Solução Salina Fosfatada Tamponada pH 7,0, do inglês “*Phosphate buffered saline*” (PBS), composta por 100 µl de solução de cloreto de sódio a 0,8% (Synth, Brasil), cloreto de potássio a 0,020% (Merck, Alemanha), fosfato de sódio dibásico a 0,115% (Vetec, Brasil) e fosfato de potássio monobásico a 0,020% (Synth, Brasil), com o volume completado para um litro. Após todas as diluições da suspensão bacteriana, 10 µl de cada diluição foram semeados em superfície em pontos nas placas de ágar BHI, sendo estas placas posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas.

Ao final dos experimentos, que foram realizados em duplicata, os dados foram plotados no programa Excel (Microsoft, Estados Unidos, 2010), e foi construída a curva de crescimento, que indicaria com qual tempo de incubação deveria ser realizada a diluição para se obter o inóculo ajustado (10^5 UFC/ml, o que daria um inóculo inicial de 10^4 UFC/ml, no poço da microplaca).

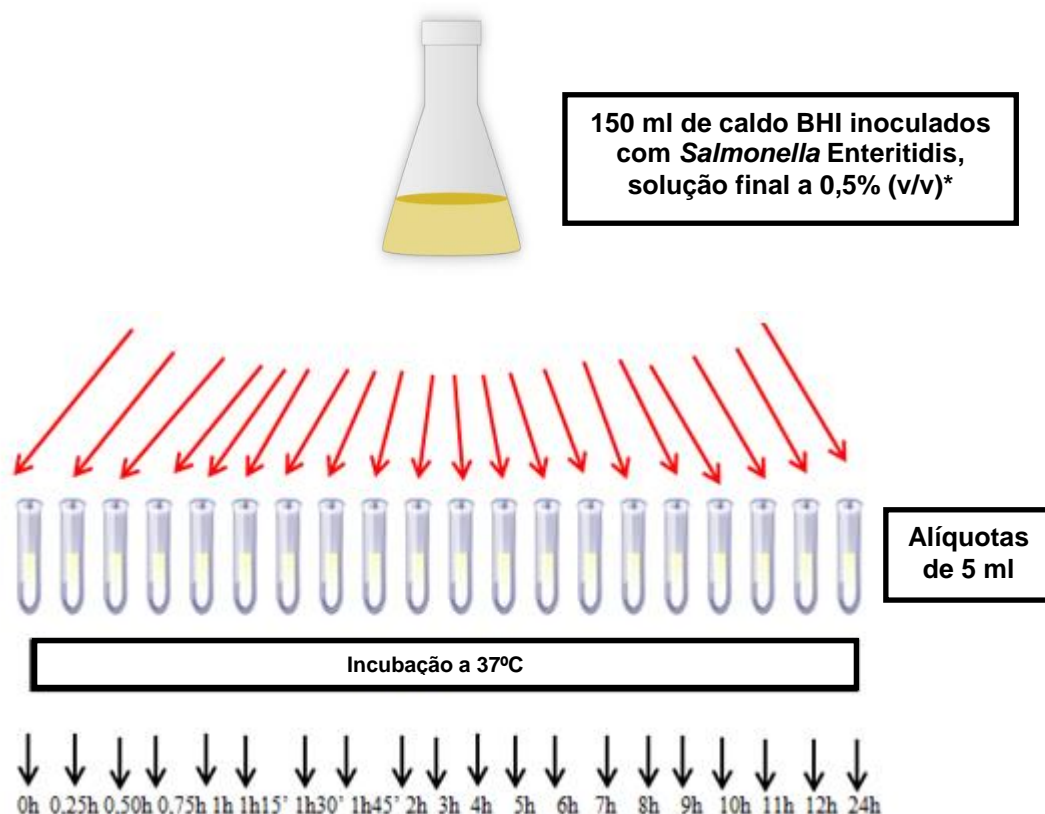


Figura 4. Ilustração da metodologia seguida para construção da curva de crescimento de *Salmonella* Enteritidis. *A bactéria foi previamente reativada em caldo BHI com glicerol (20%) por 24 horas a 37°C.

3.3 Óleos essenciais: obtenção, determinação da CIM e CBM, e padronização do controle negativo de crescimento

Os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* foram gentilmente cedidos pela Prof.^a Dr.^a Nieve Araçari Jacometti Cardoso Furtado, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. As folhas secas de *C. citratus* (obtidas em 02 de abril de 2012, lote 25SDM), *I. verum* (obtidas em 02/11/2011, lote ANIS02/1111), *Z. officinale* (obtidas em 12/03/2012, lote 02SDM) e *E. globulus* (obtidas 10/10/2011, lote 04SDM) foram adquiridas da empresa Oficina de Ervas Produtos Naturais, Ribeirão Preto, Brasil (CNPJ: 08.898.383/0001-79), e a extração dos óleos foi realizada pela MSc. Ingrid Pontes de Souza.

Os óleos foram extraídos por hidrodestilação usando o aparelho de Clevenger modificado, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1996-2004). Para isso, em um balão de fundo redondo de 6 litros foram colocados 150 gramas de extrato seco de folhas de *Cymbopogon citratus*, e em seguida foram adicionados três litros de água purificada. O balão foi colocado na manta aquecedora e quando a água atingiu seu ponto de ebulição, foi diminuído o aquecimento. As substâncias voláteis como a água e o óleo essencial evaporaram, e ao entrarem em contato com as paredes do condensador, constantemente refrigerado por uma bomba de circulação de água (banho termostático), estes produtos voláteis se condensaram, e já liquefeitos se dividiram em duas fases: a menos densa contendo o óleo essencial, estando este depositado sobre uma camada de água correspondente à fase mais densa. Os destilados foram recolhidos e separados em funil de separação e, após a vazão da água, as fases oleosas de cada extrato foram reservadas para este estudo. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção dos óleos essenciais de *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus*, a partir dos extratos secos de cada planta. Esses óleos foram armazenados a -20°C em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados e identificados.

De cada extrato obtido por hidrodestilação, 100 µl foram diluídos em 40 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, Estados Unidos), e em 860 µl de água purificada esterilizada, para obtenção de solução a 10% (v/v) (Figura 5).

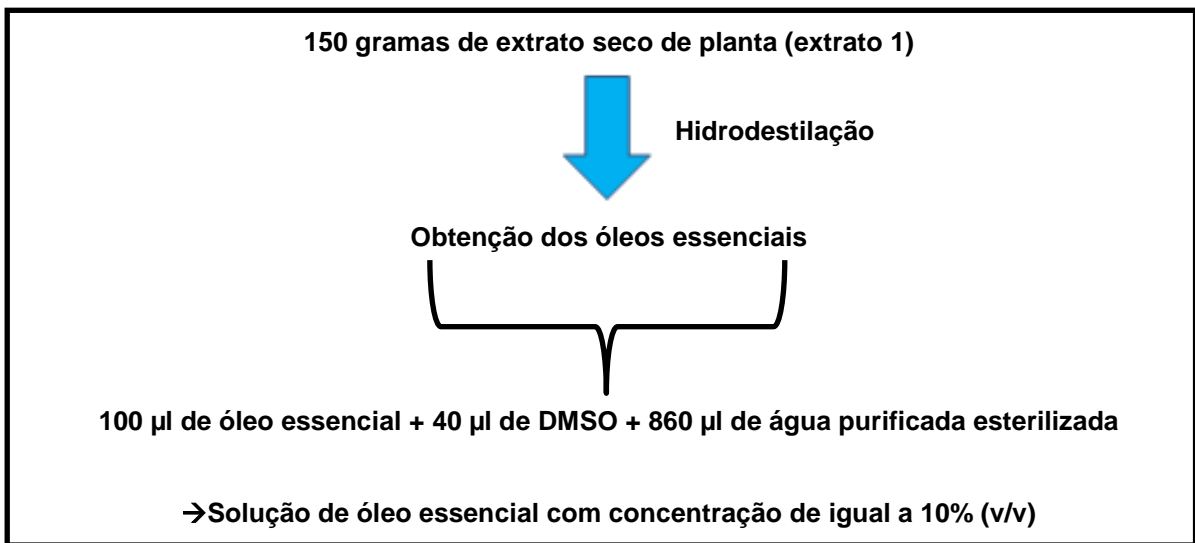


Figura 5. Fluxograma seguido para a obtenção dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Illicium verum* (anis estrelado), *Zingiber officinale* (gengibre) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto) utilizados neste projeto.

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais foi empregado o método de microdiluição em caldo segundo o “CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE” (2003), e JADHAV *et al.* (2013), com modificações. Foram distribuídos 80 µl de caldo BHI em 72 poços de uma microplaca de poliestireno de 96 poços (Corning/Costar, Estados Unidos). Posteriormente, 80 µl de cada solução de óleo essencial a 10% (v/v) foram colocados nos primeiros poços de três fileiras consecutivas (A1, B1 e C1, por exemplo), para a obtenção de triplicatas independentes (Figura 6). As fileiras subsequentes (D, E e F, por exemplo) foram usadas para um segundo óleo essencial. Em outra microplaca foi feito o mesmo procedimento para outros dois óleos essenciais.

Em seguida, foram feitas diluições, homogeneizando-se com micropipeta o conteúdo dos poços A (1 a 12) até F (1 até 12) das duas microplacas, a fim de obter diluições seriadas do óleo essencial com concentrações iguais a 4%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,062%; 0,031%; 0,015%; 0,007%; 0,003% e 0,001% (v/v) (Figura 6). Posteriormente, 20 µl da cultura reativada de *Salmonella* Enteritidis por 4 horas a 37°C correspondendo a 10^5 UFC/ml foram adicionados aos poços A1 até F12, e também aos poços controle G2 e H1 de cada placa, que continham 80 µl de caldo BHI (Figura 6). A composição de todos os poços controles é apresentada na tabela

1. A microplaca de 96 poços foi incubada a 37°C, por 24 horas. A população bacteriana do poço H1 foi enumerada pelo método *drop plate* descrito no item 3.2, para conferir o nível de inoculação. Completadas 24 horas de incubação da microplaca, foi realizada a leitura dos resultados para determinação da CIM de cada óleo essencial. Essa leitura foi feita a olho nu, considerando-se a CIM como a concentração do último poço em que não houve crescimento visível (sem turvação).

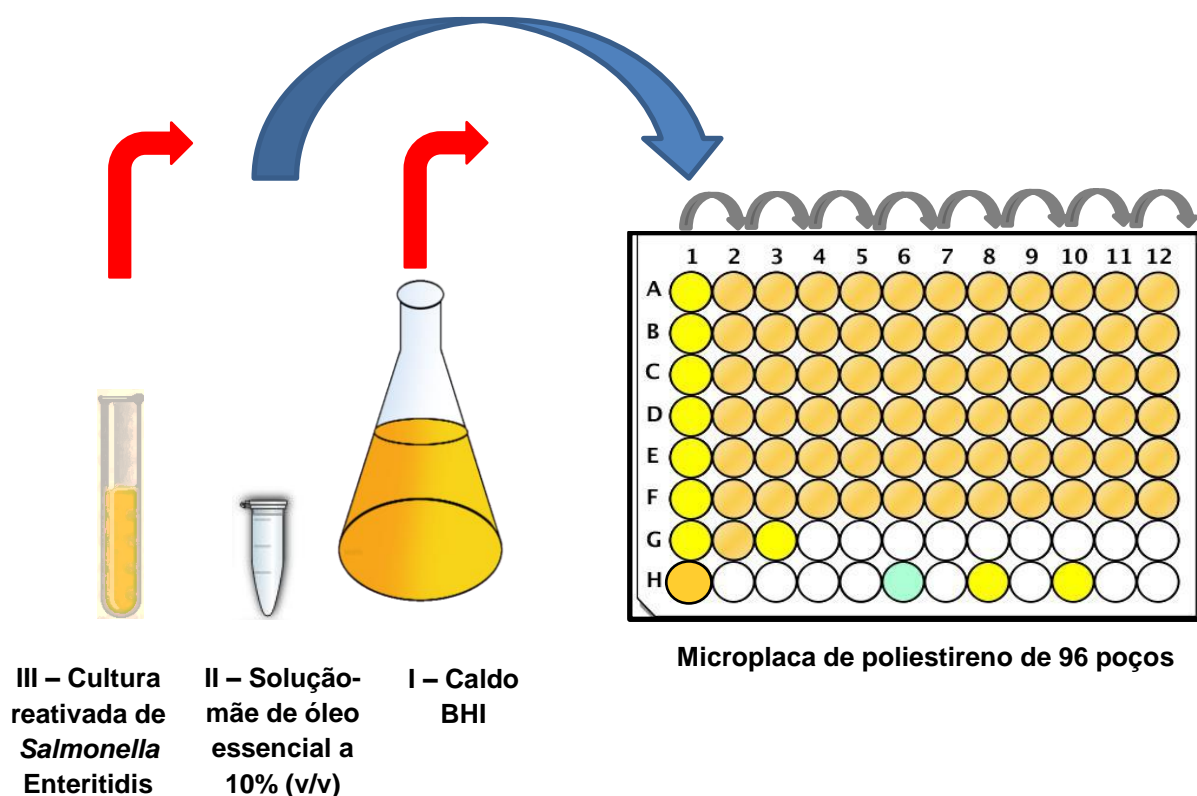


Figura 6. Representação esquemática da metodologia para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais. Está ilustrada a microplaca de poliestireno de 96 poços. Os poços A1 a F12 continham: I - 80 µl de caldo BHI; II - Os poços A1 a C12 foram adicionados de 80 µl de um óleo essencial diluído serialmente (1:2) e, os poços D1 a F12 foram adicionados de 80 µl de outro óleo essencial também diluído serialmente (1:2); e III - 20 µl da cultura reativada de *Salmonella* Enteritidis (inóculo ajustado com 10⁵ UFC/ml) foram adicionados em todos os poços. Os poços G1, G2, G3, H1, H6, H8 e H10 correspondiam aos controles detalhados na tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos controles utilizados nos ensaios para determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais frente a células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis*

	Caldo BHI	Óleo essencial	Inóculo ajustado (10 ⁵ UFC/ml)	DMSO 4%	Polimixina B 0,31µg/ml
G1 – controle negativo	100 µl	-	-	-	-
G2 – controle positivo	80 µl	-	20 µl	-	-
G3 – controle negativo	20 µl	80 µl do poço A12	-	-	-
H1 – drop plate	80 µl	-	20 µl	-	-
H6 – controle negativo	-	-	20 µl	-	80 µl
H8 – controle negativo	5 µl	-	-	95 µl	-
H10 – controle negativo	20 µl	80 µl do poço D12	-	-	-

*Nos poços controle negativos não deveria haver crescimento bacteriano. O poço controle negativo G1 continha 100 µl de caldo BHI (controle de esterilidade do meio de cultura). Os poços G3 e H10 continham apenas caldo BHI e os óleos essenciais. O conteúdo do poço H1 foi utilizado para enumeração da população de *S. Enteritidis* pelo método *drop plate* para checar o nível de inoculação. O poço H6 era o controle negativo preparado com polimixina B. O poço controle H8 era o controle para a esterilidade do DMSO. O poço G2 era um controle positivo.

Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) 10 µl de cada poço onde não havia turvação foram semeados em pontos na superfície de placas contendo ágar BHI, sendo estas placas posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. A determinação da CBM se deu de acordo com a metodologia descrita por Jadhav *et al.* (2013) e foi considerada a última diluição em que não houve crescimento bacteriano.

Conforme a tabela 1, o antibiótico adotado como controle negativo de crescimento nos experimentos de determinação da CIM e da CBM dos óleos essenciais foi a polimixina B (Inlab, Brasil). A solução-estoque aquosa de polimixina B de concentração 5 mg/ml foi preparada de acordo com Burgos *et al.* (2012). Essa solução foi esterilizada por filtração (Millipore, 0,22 mm), distribuída em alíquotas (1 ml), e armazenada sob refrigeração a 8°C. Dessa solução-mãe, foram retirados 20 µl e transferidos para microtubos Eppendorf contendo 480 µl de água purificada esterilizada, sendo a concentração final desta solução de trabalho igual a 0,2 mg/ml (200 µg/ml).

Os experimentos de determinação da CIM e CBM da polimixina B foram realizados de acordo com a metodologia já descrita para os óleos essenciais. No ensaio de determinação da CIM da polimixina B as diluições seriadas possuíam concentrações de 80; 40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156; 0,078; 0,039 µg/ml. A leitura dos resultados dos experimentos para determinação da CIM e da CBM da polimixina B foi realizada com os mesmos critérios adotados para a leitura dos resultados para os óleos essenciais. Os poços controles preparados para os experimentos com polimixina B são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos controles utilizados nos experimentos realizados para determinação da CIM e da CBM do antibiótico polimixina B frente a células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis*

	Caldo BHI	Polimixina B	Inóculo ajustado (10 ⁵ UFC/ml)
G1 – controle negativo	100 µl	-	-
G2 – controle positivo	80 µl	-	20 µl
G3 – controle negativo	20 µl	80 µl do poço A12	-
H1 – drop plate	80 µl	-	20 µl

*Nos poços controle negativos não deveria haver crescimento bacteriano. O poço controle negativo G1 continha 100 µl de caldo BHI (controle de esterilidade do meio de cultura). O poço G3 continha apenas caldo BHI e polimixina B. O conteúdo do poço H1 foi utilizado para enumeração da população de *S. Enteritidis* pelo método *drop plate* para checar o nível de inoculação. O poço G2 era um controle positivo.

3.4 Formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis em superfície de aço inoxidável

Nesta etapa, a superfície abiótica utilizada para formação dos biofilmes foram cupons circulares de aço inoxidável (AISI 304) com área total de 2,45 cm², previamente tratados de acordo com a metodologia descrita por Winkelströter *et al.* (2011). Os cupons inicialmente foram lavados com Extran MA02 (Merck, Alemanha), fervidos durante cinco minutos em solução de lauril sulfato de sódio 1% (Vetec, Estados Unidos), enxaguados em água corrente e em água purificada esterilizada, imersos em álcool etílico 95% (Synth, Brasil) por cinco minutos e enxaguados com água purificada esterilizada. Finalmente, antecedendo o início dos ensaios de formação de biofilmes, esses cupons foram esterilizados a 121°C por 15 minutos.

A formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis nos cupons circulares de aço inoxidável foi realizada segundo a metodologia de SILVA *et al.* (2008), com modificações. Os experimentos foram realizados em duplicata e, oito cupons foram transferidos para uma microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) com o auxílio de uma pinça esterilizada. A seguir, foram adicionados a cada um dos oito poços que continham cupons, 2 ml de caldo BHI e 20 µl da cultura reativada de *S. Enteritidis* a 37°C por 24 horas (10⁷ células/ml) (Figura 7). A microplaca de 24 poços foi incubada por quatro dias a 25°C, com agitação orbital de 120 rpm.

Cada par de cupons recebeu, após quatro dias de incubação, o tratamento com um dos óleos essenciais, exceto com o óleo de anis estrelado. A cada ensaio foram realizadas contagens (UFC/ml) de *Salmonella* Enteritidis a partir do tempo zero, pelo método *drop plate*.

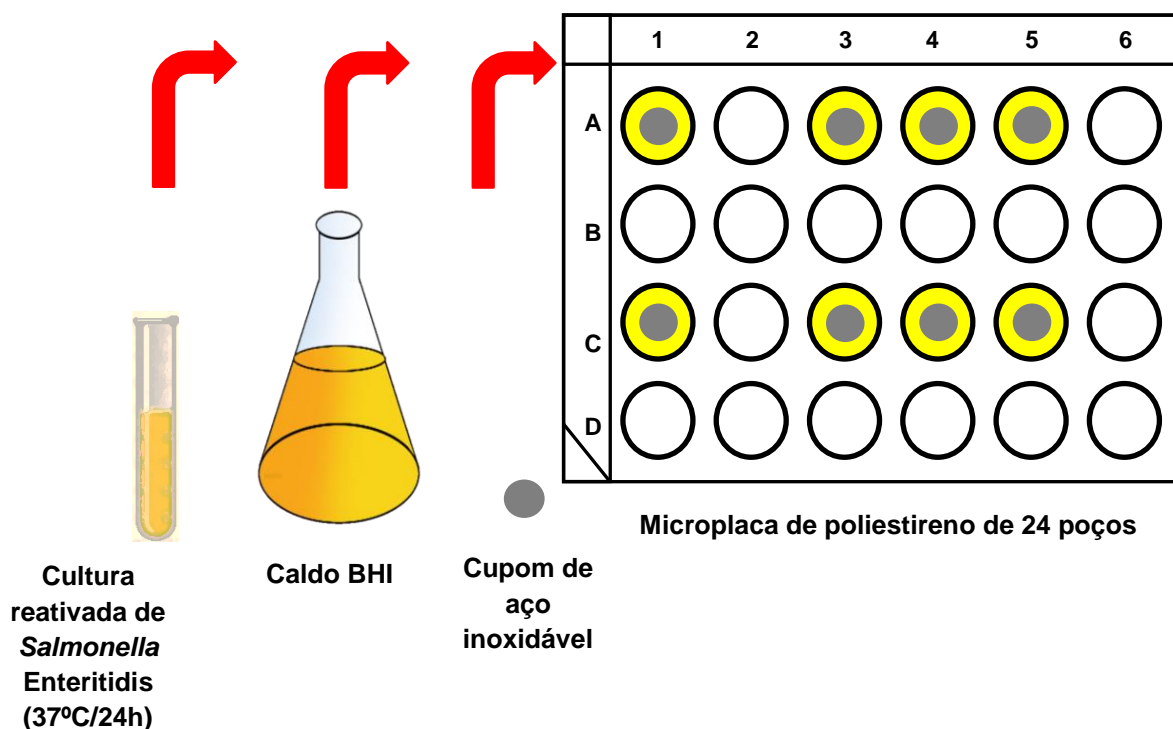


Figura 7. Representação esquemática da metodologia utilizada para os estudos de formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis em superfície de aço inoxidável. Está ilustrada a microplaca de poliestireno de 24 poços onde A1, A3, A4, A5, C1, C3, C4 e C5 continham: Um cupom de aço inoxidável (2,45 cm² de diâmetro), 2 ml de caldo BHI e 20 µl da cultura reativada de *Salmonella* Enteritidis. Os outros poços não foram utilizados nos experimentos.

3.5 Inibição da formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis pelos óleos essenciais

Para tratamento dos biofilmes de *Salmonella* Enteritidis pré-formados após quatro dias de incubação, primeiramente o meio de cultura foi removido dos poços com o auxílio de uma micropipeta e em seguida descartado. Na sequência, os cupons foram retirados dos poços com uma pinça esterilizada e lavados com 3 X 1 ml de solução PBS para remoção das células bacterianas não aderentes. Os cupons foram transferidos para outros poços da microplaca e foram tratados com 500 µl das soluções de óleos essenciais. Cada solução continha 600 µl de água purificada esterilizada e 400 µl de um único óleo essencial: *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Zingiber officinale* (gengibre) ou *Eucalyptus globulus* (eucalipto), exceto de

Illicium verum (anis estrelado). Todos os cupons ficaram imersos nas respectivas soluções de óleos essenciais por 1 hora a 25°C sob agitação orbital de 120 rpm. Dois cupons controles não receberam tratamento com óleos essenciais, sendo imersos somente em 500 µl de solução PBS e mantidos por 1 hora a 25°C sob agitação orbital de 120 rpm.

Após 1 hora, as soluções em que os cupons permaneceram imersos foram descartadas, e cada cupom foi novamente lavado com solução PBS (3 X 1 ml). Esses cupons foram então assepticamente transferidos para tubos Falcon contendo 10 ml de solução PBS cada. Para a remoção das células aderidas aos cupons os tubos Falcon foram agitados em banho de ultrassom (50-60 kHz, Odontobrás, Brasil) durante 2 minutos, e em seguida por 1 minuto em agitador tipo vortex (Phoenix, Brasil), de acordo com Leriche e Carpentier (1995), com modificações (Figura 8). A partir do conteúdo de cada tubo foram realizadas diluições decimais seriadas e 10 µl de cada diluição foram semeados pelo método *drop plate* em placas de ágar BHI, incubadas a 37°C por 24 horas.

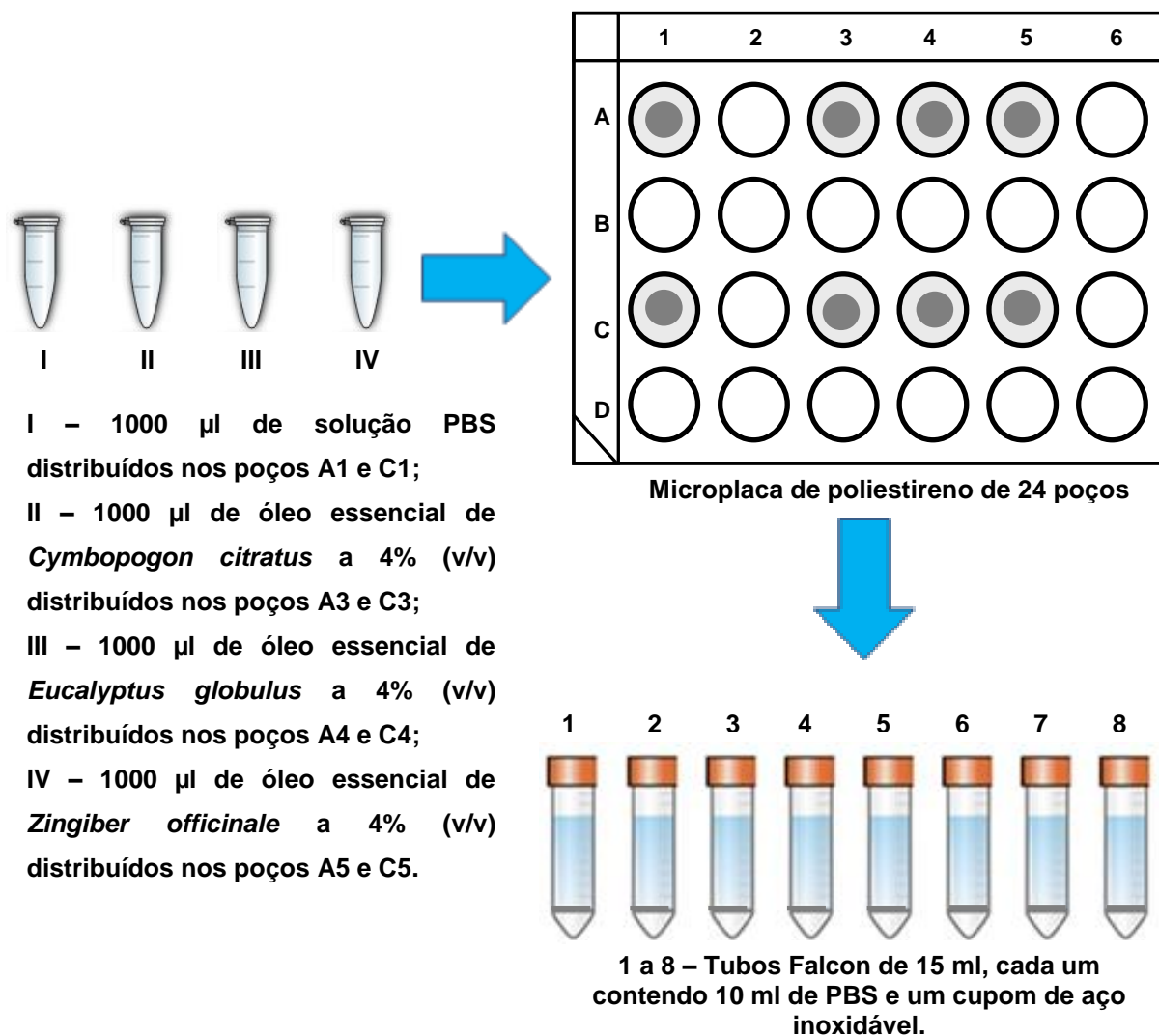


Figura 8. Representação esquemática da metodologia utilizada para o estudo da inibição da formação de biofilme pelos óleos essenciais. Está ilustrada a microplaca de poliestireno de 24 poços. Após 1 hora imersos a 25°C sob agitação orbital de 120 rpm nas respectivas soluções, os oito cupons foram lavados com 3 X 1 ml de solução PBS e transferidos para tubos Falcon contendo 10 ml de solução PBS (enumerados de 1 a 8). Esses tubos foram agitados em banho de ultrassom por 2 minutos, e em seguida por 1 minuto em agitador tipo vortex.

3.6 Microscopia de fluorescência

Visando corroborar os resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais observados pela técnica de cultivo, foi realizada microscopia de fluorescência segundo a metodologia de Wang *et al.* (2013), a fim de identificar o estado fisiológico das bactérias (células viáveis ou mortas) após o tratamento do biofilme de *Salmonella* Enteritidis com as soluções dos óleos essenciais. Após

cultura de *S. Enteritidis* nas condições descritas no item 3.5, os cupons de aço inoxidável foram assepticamente lavados com 3 X 1 ml de solução PBS, e em seguida foram transferidos para poços vazios da microplaca de 24 poços. Os biofilmes formados nos cupons foram corados com Kits de Viabilidade Bacteriana *LIVE/DEAD BacLight* (Invitrogen/Molecular Probes, Estados Unidos). Esse kit continha um corante fluorescente de ácidos nucleicos, o SYTO9 (excitação/emissão: 480/500 nm) que emite fluorescência verde identificando organismos viáveis com membranas intactas. O kit *LIVE/DEAD* também contém iodeto de propídio (excitação/emissão: 490/635 nm) que emite fluorescência vermelha identificando células mortas com danos na membrana. Assim, células viáveis e mortas podem ser visualizadas simultaneamente.

Foram adicionados a cada poço contendo cupons de aço inoxidável 250 µl de solução, esta composta por 1,5 µl de cada corante diluídos em 997 µl de solução salina 0,85%, totalizando 1 ml de solução. Após 20 minutos em sala escura, os cupons foram lavados em solução PBS (2 X 1 ml) para a retirada do excesso de corantes. As imagens dos biofilmes foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência (Nikon, 80i, Japão) com as objetivas de aumento 20x.

3.7 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Os componentes do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foram identificados através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Para isso, foi utilizado o equipamento Shimadzu (modelo GC-MS QP-2010, Japão) equipado com fonte de ionização eletrônica (IE) e analisador tipo quadrupolar. Esse procedimento foi gentilmente realizado pela técnica Isabel Cristina Casanova Turatti do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob responsabilidade do Prof.^o Dr.^o Norberto Peporine Lopes. As condições cromatográficas utilizadas foram coluna DB-5MS (0.25 mm x 0.25 µm 30 mx, Phenomenex, Estados Unidos), temperatura do injetor de 250°C e hidrogênio utilizado como fase móvel (fluxo de gás: 1,3 ml.min⁻¹).

A temperatura da coluna foi inicialmente programada para 60°C por 1 minuto, aumentando para 240°C em 10 minutos e, mantida esta temperatura por 60 minutos.

Após a eluição, as amostras foram direcionadas pelo divisor de fluxo para a fonte de ionização na proporção de 1:20. A temperatura da fonte foi ajustada em 250°C, a energia do feixe de elétrons foi 70 eV e o analisador foi controlado para separar íons de 40 a 400 m/z. Uma mistura de alcanos lineares (C9 à C25) foi também adicionada ao óleo essencial antes da injeção no cromatógrafo, sendo analisada nas mesmas condições, a fim de determinar o índice de Kovats (IK) dos constituintes (ADAMS, 1995).

Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção e do espectro de massas com os dados disponíveis nos bancos de dados do espectrômetro e da literatura como *Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds* (FFNSC 1.3.lib), *WILEY* (WILEY 7.LIB), e *National Institute of Standards and Technology* (NIST 08s.LIB).

O mesmo procedimento foi realizado para os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Zingiber officinale*, e os resultados foram apresentados por Reis-Teixeira (2014) e utilizados no presente trabalho.

3.8 Análise Estatística

Os resultados das contagens (UFC/cm²) dos dois experimentos independentes de inibição da formação do biofilme de *Salmonella* Enteritidis com quatro dias de incubação pela ação de cada óleo essencial foram analisados estatisticamente por meio do programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc, Estados Unidos). Os resultados foram expressos em log e analisados pelo teste estatístico ANOVA (análise de variância) de uma via, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Foi considerada como diferença estatística $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Curva de crescimento de *Salmonella* Enteritidis para determinação do inóculo ajustado

Os resultados da leitura das absorvâncias e enumeração de *Salmonella* Enteritidis em placas estão mostrados na tabela 3. A média das absorvâncias (tabela 3) foi utilizada para construir uma curva de crescimento (Figura 9).

Tabela 3 – Densidades ópticas (DO) a 600 nm e populações (P) de *Salmonella* Enteritidis enumeradas em placas de ágar BHI em diferentes tempos de incubação a 37°C em duplicatas (DO 1 e P 1, DO 2 e P 2)*

Tempo (horas)	DO 1	P 1 (log)	DO 2	P 2 (log)
0,000	0,105	7,993	0,099	7,863
0,250	0,106	8,602	0,109	7,863
0,500	0,108	9,684	0,104	-----
0,750	0,121	9,542	0,112	7,799
1,000	0,133	8,450	0,136	7,755
1,250	0,170	9,684	0,147	7,903
1,500	0,199	7,041	0,183	7,903
1,750	0,269	8,000	0,213	7,968
2,000	0,361	8,176	0,263	8,079
3,000	0,907	8,000	0,766	8,672
4,000	1,316	8,954	1,253	9,079
5,000	1,350	8,041	1,355	8,176
6,000	1,364	-----	1,314	8,919
7,000	1,313	8,146	1,318	8,079
8,000	1,437	9,477	1,318	7,079
9,000	1,437	-----	1,330	7,146
10,000	1,359	9,079	1,533	7,322
11,000	1,339	9,278	1,537	-----
12,000	1,308	9,230	1,380	-----
24,000	1,683	9,041	1,695	7,146

*As linhas tracejadas correspondem a alíquotas em que não foi possível realizar enumeração da população bacteriana.

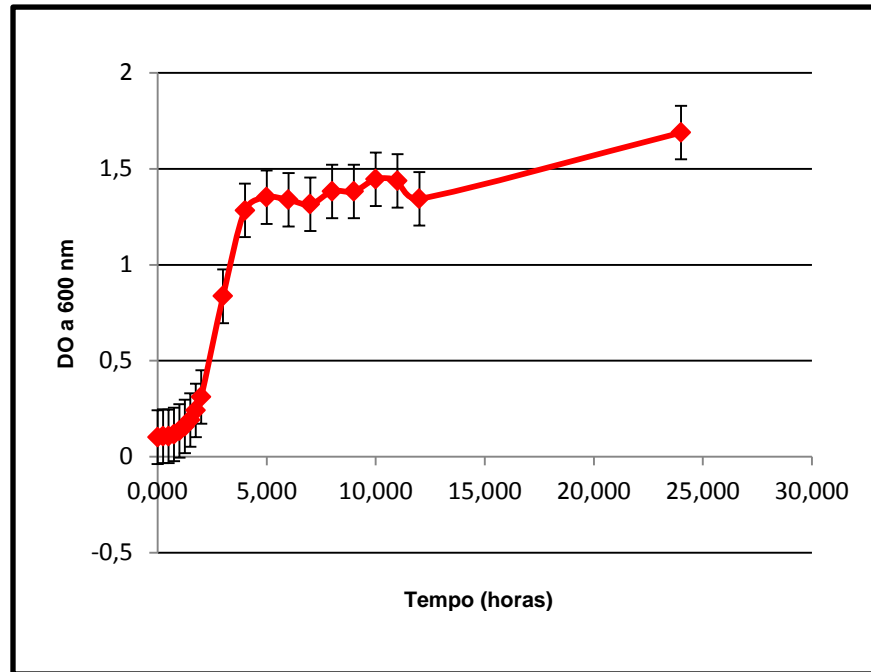


Figura 9. Curva de crescimento de *Salmonella* Enteritidis construída com as médias das densidades ópticas (DO) a 600 nm, em caldo BHI, na temperatura de 37°C.

A figura 9 apontou que após 4 horas de incubação a 37°C em caldo BHI, a cultura de *Salmonella* Enteritidis estava no final da fase exponencial de crescimento. Assim, o tempo de 4 horas de incubação foi escolhido para a realização de diluições decimais seriadas em caldo BHI, e inoculação nos experimentos para determinação da concentração inibitória mínima da polimixina B e dos óleos essenciais contra células planctônicas. A enumeração de *S. Enteritidis* em placa contendo ágar BHI e a absorbância em 600 nm indicaram que a diluição 10^{-4} continha 10^5 UFC/ml, conforme o desejado. Em todos os experimentos de determinação de CIM e CBM foi realizada a enumeração do inóculo no tempo zero pelo método de *drop plate*, para checar o nível de inoculação de 10^5 UFC/ml.

4.2 CIM E CBM dos óleos essenciais

Para determinação da CIM e CBM dos óleos essenciais foram realizados dois experimentos independentes em triplicata e os resultados obtidos estão expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados das duplicatas realizadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais frente a células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis

Células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis	
Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-limão)	CIM = 4% CBM = 4%
Óleo essencial de <i>Illicium verum</i> (anis estrelado)	Não houve inibição
Óleo essencial de <i>Zingiber officinale</i> (gengibre)	CIM = 4% CBM = 4%
Óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	CIM = 4% CBM = 4%

4.3 CIM e CBM da polimixina B

Para determinação da CIM e CBM do antibiótico polimixina B, utilizado como um controle negativo de crescimento nos ensaios de CIM e CBM dos óleos essenciais, realizaram-se dois experimentos independentes. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados das duplicatas realizadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) da polimixina B frente a células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis

Células planctônicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis	
Polimixina B	CIM = 0,31 µg/ml CBM = 0,31 µg/ml

4.4 Inibição da formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis pelos óleos essenciais

Os dois experimentos para testar a inibição da formação de biofilme de *Salmonella* Enteritidis pelos óleos essenciais foram realizados em triplicatas independentes, e pôde-se verificar em todas as repetições que os óleos de *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* na concentração 4% (v/v) inibiam os biofilmes de *Salmonella* Enteritidis com quatro dias de incubação a 37°C (tabela 6). A análise pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni apontou diferença estatística nestes resultados, o que corroborou a hipótese de que os óleos essenciais possuíam capacidade inibitória frente ao biofilme de *Salmonella*, o que foi verificado pelos resultados das contagens em placa (figura 10).

Tabela 6 – Populações de *Salmonella* Enteritidis em biofilmes formados em cupons de aço inoxidável, enumeradas em placas de ágar BHI pela técnica *drop plate* (UFC/cm²). Foram avaliados os grupos sem tratamento e grupos com tratamento com os óleos de *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus**

	1º Experimento (triplicata)			2º Experimento (triplicata)			Média	Desvio -Padrão
	1ª	2ª	3ª	1ª	2ª	3ª		
S. Enteritidis (controle)	4,3	4,3	4,3	5,0	3,5	3,4	4,1	0,5
S. Enteritidis + <i>C. citratus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
S. Enteritidis + <i>Z. officinale</i>	3,1	0,0	0,0	0,0	2,1	2,1	1,2	1,4
S. Enteritidis + <i>E. globulus</i>	2,1	2,1	3,0	0,0	3,0	3,3	2,3	1,2

*Resultado das contagens em placa dos experimentos de inibição do biofilme de *Salmonella* Enteritidis formado em superfície de aço inoxidável por quatro dias, após tratamento de imersão em soluções contendo óleos essenciais e imersão em solução PBS (grupo controle), por uma hora a 25°C sob agitação orbital de 120 rpm. Os resultados estão expressos como log de Unidades Formadoras de Colônias por cm² (UFC/cm²). Para análise no programa *GraphPad Prism*, nas replicatas onde não houve crescimento (abaixo do limite de detecção de 2,1 log de UFC/cm²) foi utilizado valor zero.

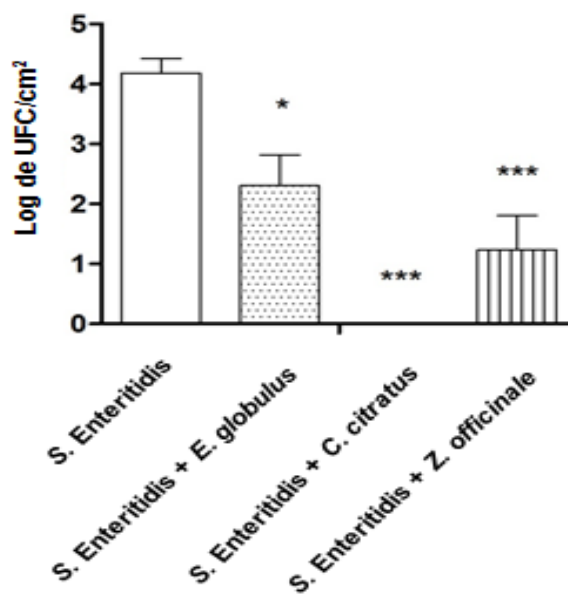


Figura 10. Populações de *S. Enteritidis* (expressas em log de UFC/cm²) aderidas a cupons circulares de aço inoxidável após quatro dias de incubação (25°C) e tratamento por 1 hora com PBS (grupo controle), ou soluções a 4% (v/v) dos óleos essenciais de *E. globulus* (eucalipto), *C. citratus* (capim-limão) e *Z. officinale* (gengibre). Foi empregada a técnica de enumeração em placa para esta determinação (item 3.2). (*) P<0,05 e (***) P<0,001.

4.5 Análise por microscopia de fluorescência

Nas lâminas contendo cupons de aço inoxidável com biofilmes de *Salmonella* Enteritidis após quatro dias de incubação, mesmo após o tratamento com os óleos essenciais de *E. globulus*, *C. citratus*, *Z. officinale* e ausência de crescimento no teste de MBC, ainda foram detectadas células viáveis sobre os cupons de aço inoxidável, por meio do corante SYTO9 (figura 11).

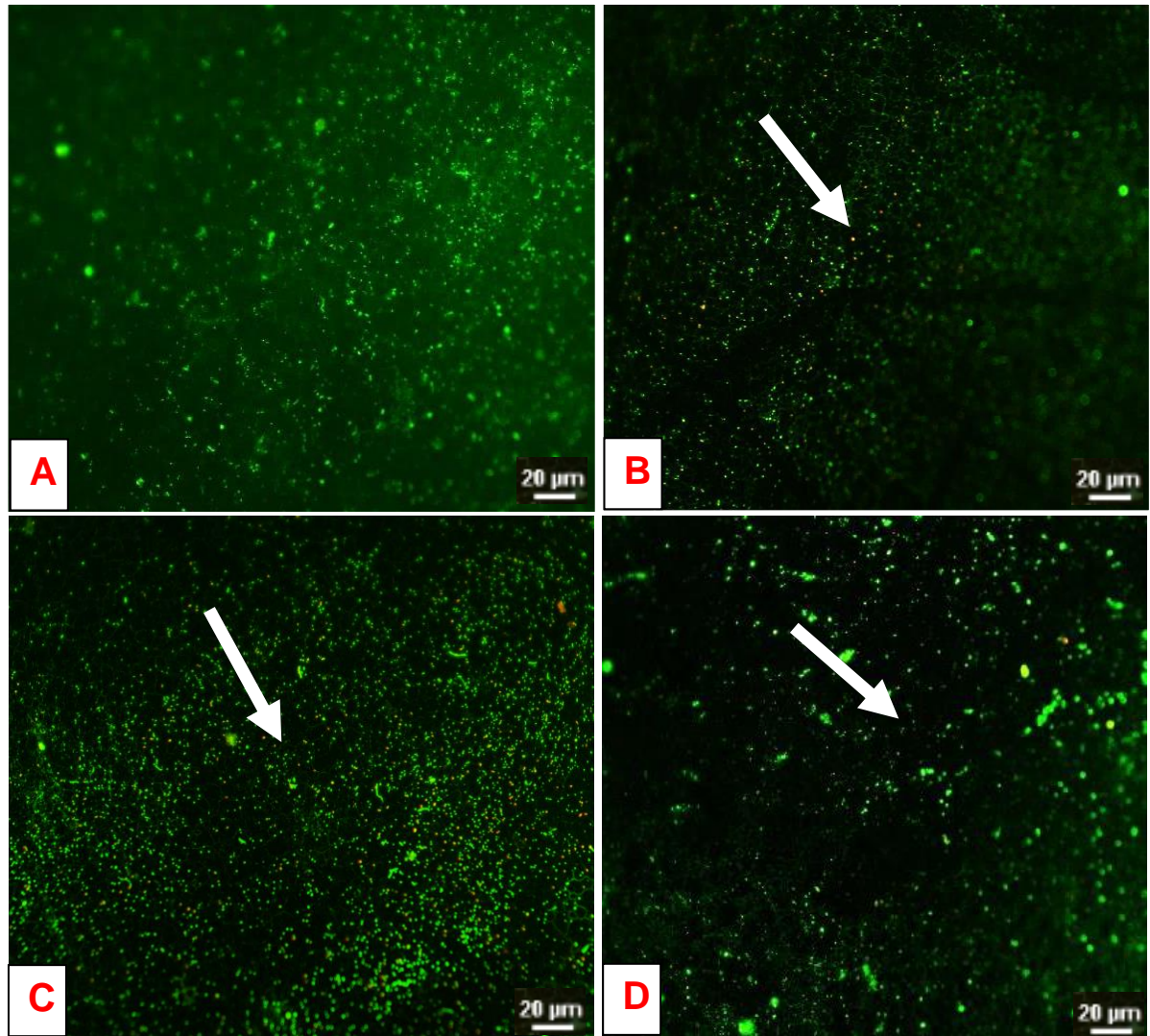


Figura 11. Imagens de microscopia de fluorescência dos cupons de aço inoxidável mostrando as células viáveis em verde e células mortas em vermelho. Em (A) grupo controle com *Salmonella* Enteritidis e em (B), (C) e (D) cupons que receberam tratamento com óleos de *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus*, respectivamente. As setas brancas indicam regiões contendo células mortas coradas em vermelho. As imagens foram adquiridas com o uso da ocular de 10x e objetiva de 20x. Escala 20 µm.

4.6 Constituintes dos óleos essenciais

Tabela 7 - Composição química (%) dos constituintes majoritários dos óleos essenciais de *C. citratus*, *Z. officinale* e *E. globulus**

	Componentes	Composição (%)
<i>C. citratus</i>¹		
	Geranial	42,26
	Neral	32,23
	B-mirceno	12,69
	Geraniol	4,49
	Isogeranial	2,26
	L-linalool	1,11
	Geranil acetato	0,83
	Sulcatone	0,65
	2-undecanona	0,34
<i>Z. officinale</i>²		
	α -zingibereno	13,56
	geranial	10,23
	α -curcumeno	10,06
	Neral	7,37
	β -sesquifelandreno	7,04
	β -bisaboleno	4,59
	Canfeno	4,36
	Eucaliptol	4,33
	α -farneseno	4,23
	β -felandreno	3,21
<i>E. globulus</i>³		
	Eucaliptol	53,73
	α -Pineno	11,66
	Aromadendreno	8,78
	Globulol	5,79

* 1 e 2, segundo dados de REIS-TEIXEIRA (2014). 3 – Dados do presente trabalho.

5. Discussão

5.1 Curva de Crescimento

Segundo Tortora *et al.* (2000) dependendo da espécie o ciclo bacteriano pode durar desde poucos dias, até um período indeterminado, em que em muitas células ainda permanecem viáveis. Por isso é interessante conhecer a taxa de crescimento da cepa em estudo buscando minimizar possíveis variações experimentais. Para determinação do inóculo ajustado de 10^5 UFC/ml requerido para os experimentos da CIM e CBM dos óleos essenciais, foi traçada uma curva de crescimento e o tempo equivalente ao final da fase log era 4 horas de incubação, sendo este o escolhido para retirada do inóculo para diluições decimais seriadas. A posterior enumeração em placas de ágar BHI indicou a diluição 10^{-4} como a que o inóculo possuía em média 10^5 UFC/ml (tabela 3 e figura 9).

Yang *et al.* (2014) demonstraram que para *Salmonella* Enteritidis o aumento da temperatura de incubação de 10°C para 25°C , para 37°C acelera significativamente a taxa de crescimento exponencial e diminui a duração da fase lag e o tempo de geração. Os resultados da curva de crescimento obtidos no presente estudo foram próximos aos resultados obtidos no estudo de Lee *et al.* (2002) sobre a ação *in vitro* de anticorpos contra *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, onde a densidade óptica em 600 nm após 4 horas de incubação a 37°C em caldo Triptona de Soja (TSB) foi de 0,6 abs enquanto neste trabalho obteve-se com 4 horas de incubação a 37°C em caldo BHI uma densidade de 1,2 abs.

5.2 CIM e CBM da polimixina B

Os resultados obtidos para determinação da CIM e CBM do antibiótico polimixina B, utilizado como controle negativo de crescimento nos experimentos de inibição dos óleos essenciais frente a células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis, foram compatíveis aos dados encontrados na literatura disponível. Burgos *et al.* (2013) testaram o efeito de polimixina B sobre células de *S. enterica* inoculadas em

meio TSB, e também a atividade desse antibiótico suplementando o efeito da bacteriocina AS-48, e suas combinações. Esses autores encontraram efeito inibitório a partir de concentrações de 2,00 µg/ml enquanto no presente trabalho, a concentração inibitória mínima determinada foi 0,31 µg/ml (tabela 5). Por meio do método de difusão em disco, Cardoso *et al.* (2006) obtiveram 100% de susceptibilidade à polimixina B de 80 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frangos, e Goodnough & Johnson (1991) encontraram que a polimixina B é fortemente bactericida para *S. Enteritidis in vitro*.

Segundo Zavascki *et al.* (2007) a polimixina é um agente bactericida de rápida ação e possui um mecanismo de ação similar ao de surfactantes, interagindo com a camada lipopolissacarídica (LPS), promovendo um processo de auto absorção. O anel policatiônico dos peptídeos da polimixina B se liga à membrana externa de bactérias Gram negativas e, por afinidade química, desloca as pontes de cálcio e magnésio que estabilizam a LPS. Esses peptídeos ao competirem com os íons acabam por romper a membrana externa da célula e a cadeia lateral de ácidos graxos, podendo interagir com a LPS, o que contribui para a dispersão da polimixina B por toda a extensão da membrana. A ação da polimixina resulta em um efeito fisiológico disruptivo, levando a alterações na permeabilidade da membrana externa. A membrana afetada apresenta “quebras” transitórias que permitem a passagem de várias moléculas, incluindo compostos hidrofóbicos e pequenas proteínas, além de promover a entrada da polimixina para dentro da célula, o que poderá levar a morte celular.

5.3 *Salmonella* Enteritidis e óleos essenciais

5.3.1 Avaliação dos resultados

O óleo essencial de *Illicium verum* (anis estrelado) não demonstrou atividade inibitória frente à cultura de *Salmonella* Enteritidis, o que foi verificado também em outros estudos que testaram a ação deste óleo contra *Salmonella* sp. Shan *et al.* (2007) não obtiveram um efeito inibitório significativo de *I. verum* sobre *Salmonella* Anatum, e sugeriram que tal resultado se deu em função do baixo teor fenólico que

este óleo possuía. De acordo com Burt (2004) os óleos essenciais (OEs) podem conter mais de 60 componentes individuais, cada um desses componentes pode ter variados modos de ação e atividade antibacteriana. Além disso, componentes fenólicos, como timol e carvacrol, têm sido apontados como os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais frente a *S. Enteritidis* e outros micro-organismos (SKANDAMIS *et al.*, 2002; GOVARIS *et al.*, 2010; SONI *et al.*, 2013).

Neste trabalho, foi verificado que óleo de *Cymbopogon citratus* a 4% (v/v) foi eficaz na inibição de células planctônicas de *S. Enteritidis* apresentando atividade inibitória em todas as replicatas, e também atividade bactericida, conforme experimentos de Concentração Bactericida Mínima (CBM), vide tabela 4. Esse óleo também demonstrou efeito inibitório mediante biofilmes com quatro dias de incubação, não havendo crescimento em placas de ágar BHI após o tratamento dos cupons de aço inoxidável com óleo de *C. citratus* (figura 10). Valeriano *et al.* (2012) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo de capim-limão contra biofilmes de *Salmonella* Enteritidis formados em cupons de aço inoxidável, pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de difusão em placa de ágar. Eles observaram uma grande zona de inibição para altas concentrações do óleo testado, sendo a CIM equivalente a 0,78 % (v/v), valor consideravelmente inferior aos resultados do presente trabalho. Entretanto, após 40 minutos de tratamento com óleo de capim-limão, não foram detectadas células aderidas pelo método de enumeração em placas de Petri contendo meio sólido, o que também foi verificado neste trabalho.

No trabalho de Bassolé *et al.* (2011) também foi constatado o efeito inibitório significativo do óleo de *C. citratus* contra *Salmonella enterica* CIP 105150 e *Salmonella* Typhimurium pelo método de difusão em disco, cujo diâmetro das zonas de inibição corresponderam a 24 e 31,7 milímetros (mm), e CIMs de 2,1 e 2,5 µg/ml, respectivamente. Tais resultados foram considerados satisfatórios, em comparação ao controle constituído pelo antibiótico tetraciclina que produziu uma zona de inibição de 23 mm. A análise química do óleo de capim-limão utilizado por Bassolé *et al.* (2011) revelou geranial (48,1%), neral (34,6%) e β-mirceno (11,0%) como componentes majoritários, o que caracteriza este óleo como tipo citral. No presente trabalho se obteve o mesmo resultado encontrado em literatura, com geranial

(42,26%), neral (32,23%) e β -mirreno (12,69%) como constituintes majoritários (tabela 7 e anexo A). Esses compostos terpênicos são conhecidos por afetar a membrana celular bacteriana, resultando em mudanças nas funções celulares e extravasamento de macromoléculas, com efeito bactericida (BASSOLÉ *et al.*, 2011).

Conforme exposto na tabela 4 e figura 10, os óleos essenciais de *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* também foram eficazes em soluções de concentração 4% (v/v), tanto para células planctônicas, quanto para biofilmes com quatro dias de incubação. Esse efeito foi determinado pela contagem em placas contendo ágar BHI e posterior análise estatística, que apontou diferença significativa e redução da população de *Salmonella* Enteritidis após o tratamento da superfície de aço inoxidável com cada um desses óleos.

Debbarma *et al.* (2013) avaliaram a ação antibacteriana do óleo de gengibre contra três sorotipos de *Salmonella enterica*, *S. Typhi*, *S. Typhimurium* e *S. Paratyphi* pela metodologia de difusão em ágar. O tratamento com o óleo resultou em um halo de inibição de 14 mm de diâmetro para *S. Typhi*, e uma CIM de 31 μ l/ml, o que está próximo a concentração de 4% (v/v) determinada neste estudo. No entanto, Debbarma *et al.* (2013) classificaram o efeito inibitório do óleo de *Z. officinale* contra essas bactérias como moderado, em relação ao grupo controle contendo o antibiótico ampicilina (diâmetro da zona de inibição de aproximadamente 27 mm), e também em comparação com outras bactérias testadas. Esses autores observaram que em geral, o OE de gengibre exibe uma melhor atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, possuindo CIMs mais baixas em relação às bactérias Gram-negativas. Esse fato está em concordância ao encontrado em literatura, uma vez que há relatos de que, em geral, bactérias Gram-negativas são mais resistentes a agentes antimicrobianos comparadas com Gram-positivas. Segundo Burt (2004), micro-organismos Gram-negativos são menos susceptíveis a ação de compostos antibacterianos possivelmente por possuírem um envelope externo de lipopolissacarídeos em torno da parede celular, o qual restringe a difusão de agentes bactericidas para o interior da célula (TYAGI & MALIK, 2011).

A composição do óleo de *Z. officinale* determinada por Debbarma *et al.* (2013) apontou α -zingibereno (27,40%), copaeno (13,81%), canfeno (11,20%), geranial (10,98%) e α -farnesceno (6,58%) como componentes majoritários, enquanto neste

estudo α -zingibereno (13,56%), geranial (10,23%) e α -curcumeno (10,06%) foram determinados como constituintes majoritários deste óleo (tabela 7 e anexo B).

Debbarma *et al.* (2013) também testaram o efeito do óleo de *E. globulus* contra sorotipos de *Salmonella enterica*, e verificaram efeito inibitório através do diâmetro das zonas de inibição, determinando um valor de CIM de 125 μ l/ml. Em relação aos constituintes majoritários determinados neste estudo e apresentados na tabela 7 e apêndice A, obteve-se 1,8-cineol (ou eucaliptol), α -pineno e aromadendreno como constituintes majoritários, detectados em 53,73, 11,66 e 8,78%, respectivamente, o que se aproxima de dados encontrados na literatura, uma vez que Tyagi & Malik (2011) também obtiveram eucaliptol como constituinte majoritário (45,4%) de *Eucalyptus globulus*. É reconhecido que esse composto, 1,8-cineol, apresenta propriedades antimicrobianas contra outros patógenos incluindo *S. aureus* (TYAGI & MALIK, 2011).

No presente trabalho, o efeito inibitório mais significativo foi observado para o óleo de *C. citratus*, seguido do óleo de *Z. officinale* e *E. globulus*, e ainda que atividades inibitórias destes mesmos óleos também tenham sido verificadas na literatura disponível, foram encontradas diferenças em relação à concentração inibitória mínima determinada em diferentes estudos. Tais diferenças podem ter se dado pela adoção de metodologias distintas, pelo perfil químico dos óleos utilizados e pela própria definição de CIM. Segundo Jiang (2011) os métodos de difusão em disco, diluição em ágar e microdiluição em caldo são comumente utilizados para se testar a atividade antimicrobiana de um composto. Entretanto, a falta de padronização dos métodos para avaliar a susceptibilidade *in vitro* de microorganismos contra agentes microbicidas pode dificultar a comparação direta entre os resultados obtidos em diferentes estudos (JIANG, 2011). De acordo com Burt (2004), o método de difusão em disco é geralmente utilizado para uma avaliação preliminar da ação antibacteriana de um determinado composto, e deve anteceder um estudo mais detalhado com métodos quantitativos como diluição em ágar ou caldo. Segundo Klancnik *et al.* (2010) a microdiluição em caldo, algumas vezes complementada pela medição dos níveis de ATP, leitura da densidade óptica e enumeração das colônias pela contagem de células viáveis, é um dos métodos mais utilizados, rápidos e precisos adotados para avaliação da eficiência antimicrobiana (BURT, 2004; KLANCNIK *et al.*, 2010).

Além disso, o perfil químico dos óleos essenciais utilizados em cada trabalho pode não ser o mesmo, ainda que tenham sido obtidos da mesma espécie vegetal. Muitos fatores intrínsecos à planta como variação genética, ecotipo ou variedade, estado nutricional, idade e estágio do ciclo vegetativo, estresses durante o crescimento ou maturidade, e ainda a composição do solo, aplicação de fertilizantes, localização geográfica, clima, variações sazonais, condições pós-colheita e de estocagem afetam a qualidade, a quantidade e a composição química de seus óleos essenciais. Ainda, a parte utilizada da planta e o método de extração adotado determinam o rendimento e composição dos constituintes de um óleo essencial, não somente a diversidade de moléculas, mas também o tipo estereoquímico das moléculas extraídas, o que conseqüentemente irá interferir na atividade biológica deste óleo (BAKKALI *et al.*, 2008; RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

Outro fator que pode causar discrepâncias entre resultados de trabalhos distintos, comprometendo a correlação entre os mesmos, é o modo como a concentração inibitória mínima é determinada. A concentração inibitória mínima é citada pela maioria dos pesquisadores para a mensuração do desempenho antibacteriano dos óleos essenciais. Entretanto, a definição de CIM difere entre as publicações, sendo este outro obstáculo para a comparação entre estudos. Em alguns casos a CBM ou a concentração bacteriostática são também indicadas, e ambos os termos têm estreita relação com a CIM (BURT, 2004). Segundo Aldridge & Johnson (1997) e Kowalski *et al.* (2005), a CIM pode ser determinada pela moda, concentração que ocorre na maior frequência dentre todas as observações, pela CIM₅₀, concentração que inibe o crescimento de 50% dos micro-organismos isolados testados, ou ainda CIM₉₀ concentração que inibe 90% do inóculo. Além disso, há trabalhos que avaliam a CIM de óleos essenciais contra células planctônicas em comparação a trabalhos que estudam o efeito de OEs em biofilmes, o que também compromete a comparação de resultados e ao mesmo tempo torna esta uma área promissora para pesquisas futuras.

5.3.2 Mecanismos de ação

Os mecanismos de ação de óleos essenciais ainda não foram completamente elucidados, mas algumas informações vêm sendo obtidas ao longo dos anos. Considerando-se o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presentes em OEs, provavelmente sua atividade antibacteriana não se deva a um mecanismo específico, e assim, vários alvos podem ser atingidos na célula bacteriana. A natureza hidrofóbica dos óleos essenciais e seus constituintes lhes permite interagir com a camada lipídica da parede e membrana celular bacteriana e também das mitocôndrias, causando uma perturbação na integridade destas estruturas aumentando sua permeabilidade e afetando a respiração bacteriana. Esses eventos podem levar a lise desses envoltórios e ao extravasamento de íons e outros conteúdos celulares que, caso ocorram de forma massiva, ocasionará morte celular (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008; BAJPAI *et al.*, 2012).

Óleos essenciais também parecem atuar em proteínas transmembrana da membrana citoplasmática como ATPases, por exemplo. As moléculas de hidrocarboneto lipofílicas dos OEs podem se acumular na bicamada lipídica e interferir na interação lipídio-proteína transmembrana, sendo outra possibilidade a interação direta dos compostos lipofílicos com as partes hidrofóbicas da proteína. Além disso, foi reportado na literatura que soluções de óleos essenciais podem causar danos a membranas proteicas, coagulação do citoplasma e depleção da força próton-motriz (BURT, 2004). Muitos óleos são responsáveis pela inibição de proteínas enzimáticas e desnaturação de proteínas citoplasmáticas, e todos esses efeitos somados resultam em perda da viabilidade ou morte celular (BURT 2004; BAJPAI *et al.*, 2012; RAUT & KARUPPAYIL, 2014).

5.3.3 Determinação de viabilidade celular

As imagens de microscopia de fluorescência deste trabalho mostradas na figura 11 revelaram a presença de células mortas coradas em vermelho e uma significativa redução na quantidade de matriz extracelular polimérica, possivelmente em função do tratamento com os óleos, o que condiz com os resultados de

enumeração. Porém, foi também detectada a presença de células viáveis remanescentes após o tratamento do biofilme com os óleos de *C. citratus*, *Z. officinale* e *Eucalyptus globulus*. A presença de células viáveis após os tratamentos, indicada pelo método de microscopia, mas não pelo cultivo, permite supor que os óleos de capim-limão, eucalipto e gengibre apresentem efeito bacteriostático e, portanto, inibitório, mas não bactericida. Tal sugestão baseia-se ainda no fato de que durante algumas replicatas para determinação da CIM, não foi detectado crescimento visível para os OEs de gengibre e eucalipto no poço de concentração 4% (v/v), entretanto, na subsequente determinação da CBM, houve crescimento em placa contendo ágar BHI. Barbosa *et al.* (2009) também sugeriram um efeito bacteriostático após análise dos resultados de seu trabalho sobre a inibição de óleos essenciais de capim-limão e gengibre frente a bactérias patogênicas e deteriorantes encontradas em carne, como *Salmonella* Enteritidis. Nesse trabalho, embora diferenças significativas não tenham sido encontradas, o efeito bacteriostático dos óleos foi verificado, e não houve crescimento nas primeiras 3 horas de incubação a 5°C.

Pode-se ainda propor que as bactérias viáveis reveladas por microscopia fossem não cultiváveis, pois em algumas replicatas não houve crescimento em placa de Petri contendo ágar BHI. Sabe-se que micro-organismos não esporulados são capazes de sobreviver em ambientes inóspitos sob a forma de células vegetativas com baixa atividade metabólica, via ativação do estado viável mas não cultivável (HEIM *et al.*, 2002). Segundo Fakruddin *et al.* (2013) essas células seriam incapazes de se multiplicar em um meio de cultura que normalmente propiciaria seu crescimento.

Em seu trabalho, Valeriano *et al.* (2012) também demonstraram a efetividade anti-biofilme das soluções de OEs empregadas, relatando que, após 20 e 40 minutos de tratamento, não foram detectadas células aderidas. Aqueles autores sugeriram que isso ocorreu porque o número de células do biofilme estava abaixo do limite de detecção do método de semeadura em placa. Isto também pode ter ocorrido no presente trabalho, o que esclareceria a presença de células viáveis demonstradas por microscopia de fluorescência. Isso reforça a importância da utilização de ferramentas complementares como a microscopia, para uma avaliação mais precisa e segura da ação de compostos antimicrobianos.

Considerações finais

6. Considerações finais

São evidentes as consequências negativas que a presença de micro-organismos patogênicos nos alimentos pode gerar para a sociedade como surtos alimentares e hospitalizações administradas pelos sistemas de saúde pública, mortes, perdas econômicas, dentre outras. Além disso, não há um método vigente capaz de remover completamente os micro-organismos encontrados em equipamentos e superfícies de processamento. Neste sentido, os trabalhos que propõem e testam novas estratégias para a prevenção e controle de patógenos de origem alimentar são necessários.

Mediante os resultados observados e aqueles encontrados na literatura, foi constatado que os óleos de *Cymbopogon citratus*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* exercem efeito inibitório frente à cultura de *Salmonella* Enteritidis, sendo que células sésseis apresentaram maior sensibilidade à ação do óleo de capim-limão, em comparação aos óleos de gengibre e eucalipto. Entretanto, sugere-se a necessidade de mais trabalhos para avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais e seus constituintes majoritários contra biofilmes de micro-organismos patogênicos encontrados em indústrias de alimentos, aprimorando técnicas e metodologias que possam detectar com precisão e potencializar a ação inibitória e bactericida desses compostos.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, R. P. **Identification oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 468p.

ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O.; NEMMAR, A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 409 – 420, 2008.

ALDRIDGE, K. E.; JOHNSON, W. D. A comparison of susceptibility results of the *Bacterioides fragilis* group and other anaerobes by traditional MIC results and statistical methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 319 – 324, 1997.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências /surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, p. 1139 – 1145, 2006.

ANDREWS-POLYMENIS, H. L.; BAUMLER, A. J.; MCCORMICK, B. A.; FANG, F.C. Taming the Elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis and prevention. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 2356 – 2369, 2010.

ASSIS, A. A. R. **Estudo de *Mycobacterium phlei* (ATCC 11758) como agente agregante para hematita e quartzo**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K-H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722 – 734, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446 – 475, 2008.

BASSOLÉ, I. H. N.; MEDA, A. L.; BAYALA, B.; OBAME, L.C.; ILBOUDO, A. J.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C.; DICKO, M. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1070 – 1074, 2011.

BARBOSA, L. N.; RALL, V. L. M.; FERNANDES, A. A. H; USHIMARU, P. I.; PROBST, I. S.; FERNANDES, A. Jr. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 725 – 728, 2009.

BETTS, T. J. Chemical characterization of the different types of volatile oil constituents by various solute retention rates with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 33 – 46, 2001.

BERGAMINI, A. M; M; RECHE, S. H. C.; OLIVEIRA, C. C.; ZAMBINI, P. H.; OLIVEIRA, M. A. Relato de surtos alimentares de origem bacteriana – Instituto Adolfo Lutz, 2013. Disponível em: < http://www.ial.sp.gov.br/pdf_bial/004.pdf.> Acesso em: 05/09/2014.

BORIE, C.; ALBALA, I.; SÁNCHEZ, P.; SÁNCHEZ, M. L.; RAMÍREZ, S.; NAVARRO, C.; MORALES, M. A.; RETAMALES, A. J.; ROBESON, J. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. **Avian Diseases**, v. 52, p. 64 – 67, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES.> Acesso em: 23/09/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos (Abril / 2013), 2013. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/atividade-legislativa/comissoes/comissoes-permanentes/cmads/audiencias-publicas/audiencia-publica-2013/crueldade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais/apresentacao-da-sra-rejane-alves/view>.> Acesso em: 22/09/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos, 2014. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ManuaVEDTA.pdf>.> Acesso em: 24/09/2014.

BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale dean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 254 – 262, 2006.

BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 2163 - 2176, 2008.

BURGOS, M. J. G.; LÓPEZ, R. L.; AGUAYO, M. C. L.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides. **Food Control**, v. 30, p. 214-221, 2012.

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

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R.; PILOTTO, F.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; ROCHA, S. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Antibiotic resistance in

Salmonella Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 368 – 371, 2006.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Foodborne Illness, Foodborne Disease, (sometimes called “Food Poisoning”), 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/facts.html>> Acesso em: 1º/09/2014.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilms formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103 – 111, 2000.

CHISOWA, E. H.; HALL, D. R.; FARMAN, D. I. Volatile constituents of the essential oil of *Cymbopogon citratus* Stapf grown in Zambia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 29 – 30, 1998.

CHAVANT, P.; MARTINIE, B.G.; HÉBRAUD, M. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. **Microbiology Letters**, v. 236, p. 241 – 248, 2004.

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. 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**, v. 104, p. 1586 – 1596, 2008.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213 – 220, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow aerobically.** Approved Standard— Ed. 6^a. CLSI document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4), v. 23, n.2, 2003.

CORCORAN, M.; MORRIS, D.; DE LAPPE, N.; O'CONNOR, J.; LALOR, P.; DOCKERY, P.; CORMICAN, M. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilm from food contact surface materials. **Applied and Environmental Microbiology**, doi:10.1128/AEM.03109-13, 2013.

COSTERTON, J. W. Overview of microbial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 137 – 140, 1995.

CU, J. Q.; PERINEAU, F.; GOEPFERT, G. GC/MS analysis of star anise oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, p. 91 – 92, 1990.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 847 – 867, 2000.

DAVIDSON, P. M. **Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds.** In **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.** Nova York: ASM Press, 1997. 1098 p.

DE, M.; DE, A. K.; SEN, P; BANERJEE, A. B. Antimicrobial Properties of Star Anise (*Illicium verum* Hook F). **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 94 – 95, 2002.

DEBBARMA, J.; KISHORE, P.; NAYAK, B. B. Antibacterial activity of ginger, *Eucalyptus* and sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 1022 – 1030, 2013.

DESAI, M. A.; SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; SILVA, J. L. Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1332 – 1337, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 167 – 193, 2002.

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

DUNNE, W. M. J. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155 – 166, 2002.

ELAISSI, A.; SALAH, K. H.; MABROUK, S. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1427 – 1434, 2011.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F.A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1019 – 1024, 2001.

FAKRUDDIN, M.; MANNAN, K. S. B.; ANDREWS, S. Viable but nonculturable bacteria: Food safety and public health perspective. **ISRN Microbiology**, doi:10.1155/2013/703813, 2013.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Edição IV, parte II, 1^o-5^o fascículos, 1996-2004.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 156 – 164, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 2012. Disponível em: <

<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>.> Acesso em: 25/10/2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins, 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>.> Acesso em: 15/09/2014.

FORSYTHE, S. J.; HAYES, P. R. **Food hygiene, microbiology and HACCP**. New York: Aspen, 1998. 434p.

FOOD STANDARDS AGENCY (FSA). Outbreak of *Salmonella* in eggs now over. 2014. Disponível em: <<http://www.food.gov.uk/news-updates/news/2011/4809/eggs>.> Acesso em: 30/11/14.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HEBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G. J. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, v. 97, p. 298 – 309, 2014.

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Microbiological food safety issues in Brazil: Bacterial pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, p. 197 – 205, 2013.

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**, v. 87, p. 41 – 48, 1999.

GRAM, L.; RAVN, D. B. 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**, v. 18, p. 1165 – 1171, 2007.

GOODNOUGH, M. C.; JOHNSON, E. A. Control of *Salmonella* Enteritidis infections in poultry by polymixin B and trimethoptim. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 785 – 788, 1991.

GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 175 – 180, 2010.

GUTIERREZ, J.; RYAN, C. B.; BOURKE, P. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91 – 97, 2008.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985 – 990, 1999.

HASAN, H. A.; RAAUF, A. M. R.; RAZIK, B. M. A.; HASSAN, B. A. R. Chemical composition and antimicrobial activity of the crude extracts isolated from *Zingiber officinale* by different solvents. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 3. doi:10.4172/2153-2435.1000184, 2008.

HEIM, S.; LLEO, M. D. M.; BONATO, B.; GUZMAN, C. A.; CANEPARI, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as Determined by Proteome Analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 6739 – 6745, 2002.

HERIGSTAD, B., HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 37, p. 145 – 153, 1997.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 819 – 830, 2012.

HUSSAIN, M. A.; DAWSON, C. O. Economic impact of food safety outbreaks on food business. **Foods**, v. 2, p. 585 – 589, 2013.

INOUE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oil and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 565 – 573, 2001.

ITOGAWA, M.; ITO, C.; TOKUDA, H.; ENJO, F.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive activity of phenylpropanoids and phytoquinoids from *Illicium* plants. **Cancer Letter**, v. 214, p. 165 – 169, 2004.

JADHAV, S.; SHAH, R.; BRAVE, M.; PALOMBO, E. A. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125-130, 2013.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Berlin: Springer, 2005. 790 p.

JIANG, L. **Comparison of disk diffusion, agar dilution, and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing of five chitosans**. 2011. 65f. A thesis (Master of Science, Department of Food Science) – Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University, Louisiana, 2011.

KASALI, A. A.; OYEDJI, A. O.; ASHILOKUN, A. O. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 377 – 378, 2001.

KLANCNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERSEK, B.; MOZINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 131 – 136, 2010.

KIM, A.; LEE, Y.J.; KANG, M. S. Dissemination and tracking of *Salmonella* sp. In integrated broiler operation. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, p. 155 -161, 2007.

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**, v. 71, p. 797 – 803, 2005.

KOSTAKIOTI, M.; HADJIFRANGISKOU, M.; HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the Dawn of the postantibiotic Era. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, p. 1 – 23, 2013.

KOWALSKI, R. P.; KATHLEEN, A.; YATES, B. S.; ROMANOWSKI, E. G.; KARENCHAK, L. M. MAH, F. S.; GORDON, Y. J. An Ophthalmologist's guide to understanding antibiotic susceptibility and minimum inhibitory concentration data. **Ophthalmology**, v. 112, doi:10.1016/j.opthta.2005.06.025, 2005.

KWIECINSKIA, J.; EICKB, S.; WÓJCIKA, K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 343 – 347, 2009.

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

LAIRD, K.; ARMITAGE, D.; PHILLIPS, C. Reduction of surface contamination and biofilms of *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus* using a citrus-based vapour. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, p. 61 – 66, 2012.

LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; PATRIGNANI, F.; BELLETTI, N.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 201 – 208, 2004.

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

LEE, E. N.; SUNWOO, H. H.; MENNINEM, K.; SIM, J. S. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium. **Immunology and Molecular Biology**, v. 81, p. 632 – 641, 2002.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. Viable but nonculturable *Salmonella* Typhimurium in single- and binary-species biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1186-1191, 1995.

LI, S.; LIU, S. Chemical constituents of essential oil from Cenxi's *Illicium*. **China Condiment**, v. 20, p. 69 – 70, 2000.

LIM, T-H.; KIM, M-S.; LEE, D-H.; LEE, Y. N.; PARK, J. K.; YOUN, H. N.; LEE, H. J.; YANG, S. Y.; CHO, Y. W.; LEE, J. B.; PARK, S. Y.; CHI, I. S.; SONG, C. S. Use of bacteriophage for biological control of *Salmonella* Enteritidis infection in chicken. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 1173 – 1178, 2012.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU. F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurim LT2. **Nature**, v. 413, p. 852-856, 2001.

MENUT, C.. BESSIÈRE, J-M.; SAMATÉ, D.; DJIBO, A. K.; BUCHBAUER, G.; SCHOPPER, B. Aromatic plants in tropical West Africa, XI. Chemical composition, antioxidant and antiradical properties of the essential oils of three *Cymbopogon* species from Burkina Fasso. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 207, 2000.

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**, v. 97, p. 262 – 270, 2004.

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

MAUKONEN, J.; MATTO, J.; WIRTANEN, G.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 327 – 356, 2003.

MESOMO, M. C.; CORAZZA, M. L.; NDIAYE, P. M. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 80, p. 44 – 49, 2013.

MOLIN, S.; TOLKER-NIELSEN, T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilization of the biofilm structure. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 255 – 261, 2003.

MONTEVILLE, T. J.; MATTHEWS, K. R.; KNIEL, K. E. **Food Microbiology: An Introduction**. Washington: ASM Press, 2012. 570p.

MULYANNINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8 – cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, v. 17, p. 1061 – 1066, 2010.

NGUYEN, H. D. N.; YUK, H-G. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. **Food Control**, 29, p. 236 – 240, 2013.

NILSSON, R. E.; ROSS, T; BOWMAN, J. P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 14 -14, 2011.

NIU, C.; GILBERT. E. S. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6951 – 6956, 2004.

NOSTRO, A.; SCAFFARO, R.; D'ARRIGO, M.; BOTTA, L.; FILOCAMO, A.; MARINO, A.; BISIGNANO, G. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1029 – 1038, 2012.

NOTERMANS, S.; VERDEGAAL, A. H. Existing and emerging foodborne diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 197 – 205, 1992.

OLAYINKA, A. J.; OLAJIDE, O. O.; AFOLAYAN, M. O.; OLALEKAN, M.; AKANDE, S. A; IDIAT, I. D.; THEOPHILUS, A. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic effects of *Eucalyptus globulus* grown in north-central Nigeria. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 2, p. 1 – 8, 2012.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Salmonella* Enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 318 – 323, 2007.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of

biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, p. 549 – 553, 2010.

OLIVERO-VERBEL, J.; NERIO, L. S.; STASHENKO, E. E. Bioactivity against *Triboltum castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. **Pest Management Science**, v. 66, p. 664 – 668, 2010.

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**, v. 7, p. 89 – 95, 2002.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 1046 – 1055, 2006.

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* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 412 – 420, 2007.

PARK, S-H.; CHEON, H-L.; PARK, K-H.; CHUNG, M. S.; CHOI, S. H.; RYU, S.; KANG, D. H. Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 130 – 134, 2012.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAGUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, O.;

PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT 18. **Nature**, v. 413, p. 848 - 852, 2001.

PEREIRA, V.; DIAS, C.; VASCONCELOS, M. C.; ROSA, E.; SAAVEDRA, M. J. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 1 – 7, 2014.

PEREZ-CONESA, D.; CAO, J. CHEN, L.; MCLANDBOROUGH, L.; WEISS, J. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms by micelle-encapsulated eugenol and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 74, p. 55 – 62, 2011.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDANEVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 111, p. 808 – 811, 2006.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250 – 264, 2014.

REIS-TEIXEIRA, F. B. **Avaliação do papel de óxido nítrico, de óleos essenciais e de sanitizantes na dispersão de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em superfície abiótica.** 2014. 131 f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

ROLLER, S. The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on a European research Project. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 36, p. 333 – 345, 1995.

RUSSO, E. T.; BIGGERSTAFF, G.; HOEKSTRA, R. M.; MEYER, S.; PATEL, N.; MILLER, B.; QUICK, R. A recurrent, multistate outbreak of *Salmonella* Serotype Agona infections associated with dry, unsweetened cereal consumption, United States, 2008. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 227 – 230, 2013.

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

SANTIN, M. R.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; FERREIRA, I. C. P.; NAKAMURA, T. U. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonenses*. **Parasitology Research**, v. 5, p. 1489 – 1496, 2009.

SCHILLACI, D.; ARIZZA, V.; DAYTON, T.; CAMARDA, L.; DI STEFANO, V. *In vitro* anti-biofilm activity of *Boswellia* sp. *olegoum* resin essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 433 – 438, 2008.

SCHULTZ, M. Who is this man and what did he accomplish? **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 1939 – 1942, 2008.

SEGOVIA, I. F.; LLÁCER, A. P. PEIDRO B.; FUENTES, A. Implementation of a food safety management system according to ISSO 22000 in the food supplement industry: A case study. **Food Control**, v. 43, p. 38 – 34, 2014.

SHAN, B.; CAI, YZ.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The *in vitro* antimicrobial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 112-119, 2007.

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

SIDHU, M. S.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A. Disinfectant and antibiotic resistance of lactic acid bacterial isolated from food industry. **Microbial Drug Resistance**, v. 7, p. 73 – 83, 2001.

SILVA, S.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v.71, p. 1379-1385, 2008.

SIMÕES, M.; SILLANKOVA, S.; PEREIRA, M.; AZEREDO, J.; VIEIRA, M. J. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. **Biofouling**, v. 24, p. 249 – 258, 2007.

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

SINGH, G.; KAPOOR, L. P. S.; SING, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3295 – 3302, 2008.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G-J. E. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella* Typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 97 – 103, 2002.

SMITH-PALMER, S. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important foodborne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 118 – 122, 1998.

SONI, K. A.; OLADUNJOYE, A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; SILVA, J. L.; MIKEL, B.; BAILEY, R. H. Inhibition and inactivation of *Salmonella* Typhimurium biofilms from polystyrene and stainless steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 205 – 212, 2013.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature**, v. 6, p. 199 – 210, 2008.

SUNILSON, J. A. J.; SURAJ, R.; REJITHA, G.; ANANDARAJAGOPOAL, K. *In vitro* antimicrobial evaluation of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* and *Alpinia galanga* extracts as natural food preservatives. **American Journal of Food Technology**, v. 4, p. 192 – 200, 2009.

TASSOU, C. C.; NYCHAS, G. J. E.; Antimicrobial activity of the essential oil of mastic gym (*Pistacia lentiscus* var. *chia*) on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and in a Model Food System. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 36, p. 411 – 420, 1995.

TASSOU, C.; KOUTSOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**, v. 33, p. 273 – 280, 2000.

TOBOLDT, A.; TIETZE, E.; HELMUTH, R.; JUNKER, E.; FRUTH, A.; MALORNY, B. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Kottbus isolated in Germany from humans, food and animals. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 97 – 108, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 521p.

TYAGI, A.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, v. 126, p. 228 – 235, 2011.

VALERIANO, C.; OLIVEIRA, T. L. C.; CARVALHO, S. M.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. The sanitizing action of essential oil-based solutions

against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. **Food Control**, v. 25, p. 673 – 677, 2012.

VIEIRA, M. J. MELO, L.; PINHEIRO, M. M. Biofilm formation: Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, v. 7, p. 67 – 80, 1993.

WANG, G-H.; HU, W-T.; HUANG, B-K.; QIN, L-P. *Illicium verum*: A review on its botany, traditional use, chemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 10 20, 2011.

WANG, H.; DING, S.; WANG, G.; XU, X.; ZHOU, G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 293-302, 2013.

WINKELSTRÖTER, L. K.; GOMES, B. C.; THOMAZ, M. R. S.; SOUZA, V. M.; DE MARTINIS, E. C. P. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 22, p. 1404-1407, 2011.

WINKELSTRÖTER, L. K.; TEIXEIRA, F. B. R.; SILVA, E. P.; ALVES, V. F.; DE MARTINIS, E. C. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. **Microbial Ecology**, v. 38, p. 35 – 46, 2014.

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

WOLMUTH, H.; SMITH, M. K.; BROOKS, L. O. Essential oil composition of diploid and tetraploid clones of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) grown in Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1414 – 1419, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Working with Asian countries to improve information-sharing in food safety emergencies, 2012. Disponível em: <<http://www.wpro.who.int/mediacentre/releases/2012/20121127/en>> Acesso em: 4/09/2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2014. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/philippines/areas/communicable_diseases/continuation_cocommunicable_diseases/en/> Acesso em: 23/08/2014.

XU, H.; ZOU, Y.; LEE, H-Y.; AHN, J. Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 580 – 585, 2010.

YANG, Y.; WAN, C.; XU, H.; LAI, W.; XIONG, Y.; XU, F.; YOU, X.; XU, H.; AGUILAR, Z.P.; SUN, J.; WEI, H. Development of a multiplexed PCR assay combined with propidium monoazide treatment for rapid and accurate detection and identification of three viable *Salmonella enterica* serovars. **Food Control**, v. 28, p. 456 – 462, 2012.

YANG, Y.; KHOO, W. J.; ZHENG, Q.; CHUNG, H. J.; YUK, H. G. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/ virulence related gene expression. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 102 – 109, 2014.

ZAVASCKI, A. P.; GOLDANI, L. Z.; LI, J.; NATION, R. L. Polymixin for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 1206 – 1215, 2007.

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

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

ANEXO

Resultados da identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Zingiber officinale* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Anexo A - Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de *Cymbopogon citratus* (capim-limão)*

		<i>Cymbopogon citratus</i>			
Componentes		IR	IR (literatura)	IS	Composição (%)
1	Sulcatone	980,62	985	97	0,65
2	β -mirceno	987,41	991	96	12,69
3	Trans- β -ocimeno	1032,58	1040	97	0,18
4	ND	1088,77	–	80	0,42
5	L-linalool	1098,49	1098	96	1,11
6	ND	1140,55	–	90	0,35
7	ND	1145,71	–	89	0,19
8	ND	1158,76	–	96	1,60
9	Óxido rosa furano	1166,83	1169	92	0,14
10	Isogeranial	1177,85	1179	97	2,26
11	Neral	1237,83	1240	93	32,23
12	Geraniol	1248,77	1255	97	4,49
13	Geranial	1268,16	1273	95	42,26
14	2-undecanona	1291,11	1291	97	0,34

15	Geranil acetato	1376,29	1383	96	0,83
16	2-tridecanona	1493,22	1494	96	0,25

*ND – não determinado; IR – índice de retenção; IS – índice de similaridade.
Segundo dados de REIS-TEIXEIRA (2014).

Anexo B - Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de *Zingiber officinale* (gengibre)*

<i>Zingiber officinale</i>					
	Componentes	IR	IR (literatura)	IS	Composição (%)
1	Heptan-2-ona	894,57	891	97	0,06
2	2-Heptanol	899,55	900	99	0,83
3	Triciclono	921,58	926	94	0,07
4	α -pineno	931,16	937	97	1,34
5	Canfeno	947,74	953	97	4,36
6	Sabineno	970,09	976	91	0,05
7	β -pineno	976,33	980	97	0,21
8	Sulcatone	980,51	985	97	0,92
9	Mirceno	986,83	991	97	0,81
10	α -felandreno	1006,05	1005	94	0,13
11	p-cimeno	1022,49	1026	95	0,07
12	Limoneno	1027,12	1031	93	0,80
13	β -felandreno	1028,88	1031	93	3,21
14	Eucaliptol	1030,22	1033	93	4,33
15	α -terpinoleno	1083,32	1088	92	0,11
16	2-nonanona	1088,36	1091	95	0,32
17	rosafurano	1089,70	1091	89	0,37

18	ND	1096,71	–	76	0,17
19	linalool	1098,44	1098	97	0,99
20	2-nonanol	1100,38	1098	96	0,63
21	Citronela	1149,58	1153	97	0,72
22	Óxido rosafurano	1166,83	1169	92	0,72
23	borneol	1169,22	1165	98	1,59
24	4-terpineol	1177,87	1177	89	0,34
25	α -terpineol	1192,86	1189	96	1,73
26	β -citronelol	1224,81	1228	97	1,33
27	Neral	1236,14	1240	95	7,37
28	Geraniol	1248,03	1255	98	0,54
29	Geranial	1266,11	1256	96	10,23
30	2-undecanona	1290,83	1291	98	1,22
31	2-undecanol	1301,28	1294	96	0,23
32	α -copaeno	1371,95	1376	95	0,24
33	β -elemeno	1385,98	1375	95	0,23
34	(E)- β -farneseno	1450,57	1458	93	0,38
35	Aloaromadendreno	1454,71	1461	95	0,28
36	α -curcumeno	1478,34	1486	96	10,06
37	α -zingibereno	1492,27	1495	97	13,56
38	α -farneseno	1502,30	1508	97	4,23
39	β -bisaboleno	1504,84	1509	96	4,59

40	Cubebol	1510,61	1513	91	0,41
41	Selina-3,7(11)-dieno	1513,75	1527	91	0,49
42	β -sesquifelandreno	1520,74	1524	96	7,04
43	ND	1536,52	–	81	0,36
44	Elemol	1543,67	1549	94	0,50
45	ND	1550,51	–	86	0,44
46	Germacreno B	1552,61	1556	94	0,57
47	Nerolidol	1558,16	1565	96	1,12
48	Ledol	1585,89	1580	85	1,00
49	ND	1609,93	–	87	1,43
50	ND	1615,11	–	88	0,63
51	ND	1623,26	–	84	0,71
52	ND	1627,06	–	87	0,77
53	β -eudesmol	1648,22	1649	96	1,30
54	ND	1651,70	-	81	0,31
55	ND	1667,67	–	77	0,19
56	ND	1681,83	–	81	1,51
57	ND	1686,43	–	81	0,48
58	ND	1689,46	–	84	0,83
59	ND	1801,23	–	84	0,36
60	ND	1945,63	–	83	0,19

*ND – não determinado; IR – índice de retenção; IS – índice de similaridade. Segundo dados de REIS-TEIXEIRA (2014).

APÊNDICE

Resultados da identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Apêndice A - Composição química (%) do óleo essencial obtido de folhas secas de *Eucalyptus globulus* (eucalipto)*

<i>Eucalyptus globulus</i>					
Componentes	IR	IR (literatura)	IS	Composição (%)	
1	α -pineno	931,49	939	97	11,66
2	Campheno	947,60	953	94	0,07
3	β -Pineno	976,33	980	97	0,23
4	β -mirceno	986,96	991	96	0,14
5	m-cimeno	1022,68	1030	96	0,63
6	Limoneno	1027,56	1031	96	3,55
7	Eucaliptol	1031,78	1032	96	53,73
8	γ -terpineno	1055,26	1062	95	0,24
9	β -fenchol	1117,18	1117	91	0,08
10	Trans-pinocarveol	1138,16	1139	96	0,90
11	Pinocarvono	1159,12	1162	96	0,34
12	1-Borneol	1168,94	1173	93	0,16

13	Terpinen-4-ol	1177,95	1177	97	0,43
14	Trans-isocarveol	1184,90	1189	94	0,26
15	α -terpineol	1192,76	1189	97	1,8
16	Cis-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1226,26	1230	91	0,28
17	2,6-Octadien-1-ol,3,7-dimetil	1226,26	1230	91	0,11
18	Anethole	1283,09	1283	95	0,16
19	Isoledeno	1367,15	1372	93	0,13
20	Geranil acetato	1376,04	1381	95	0,21
21	α -gurjeneno	1402,62	1409	96	0,99
22	γ -maalieno	1422,44	1428	91	0,13
23	β -gurjeneno	1425,49	1432	93	0,44
24	Aromadendreno	1433,95	1439	96	8,78
25	Selina-5,11-dieno	1441,10	1444	92	0,23
26	Alloaromadendreno	1454,66	1460	96	1,62
27	β -selineno	1483,09	1485	92	0,49
28	Viridifloreno	1485,92	1493	95	1,47
29	γ -cadineno	1507,98	1513	92	0,12
30	ND	1511,80	-	87	0,11
31	Epiglobulol	1556,33	1532	94	1,57
32	ND	1563,32	1565	-	0,35
33	Spathulenol (CAS)1H-	1570,42	1576	92	0,09

Cycloprop[e]a

34	ND	1576,17	-	80	0,10
35	Globulol	1579,76	1576	95	5,79
36	Globulol	1587,72	1595	95	0,98
37	Cubeban-11-ol	1590,32	1599	93	0,33
38	Globulol	1597,57	1595	91	0,12
39	Rosifoliol	1600,27	1599	92	0,28
40	ND	1606,12	-	85	0,16
41	ND	1617,72	-	87	0,68

*ND – não determinado; IR – índice de retenção; IS – índice de similaridade