

## Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos

Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. as natural sanitizer for controlling the sessile bacteria and as antimicrobial on the food-cutting surfaces

RIALA6/1624

Camila Ribeiro ROCHA\*, Roberta Torres CARELI, Rayane Patrícia SILVA, Anna Christina de ALMEIDA, Ernane Ronie MARTINS, Eliandra Maria Bianchini OLIVEIRA, Eduardo Robson DUARTE

\*Endereço para correspondência: Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, MG, Brasil, CEP 39404-547. E-mail: camilaribeiorocha@yahoo.com.br.  
Recebido: 12.09.2014 - Aceito para publicação: 30.12.2014

### RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) pela técnica de macrodiluição em caldo do óleo essencial (OE) de *Rosmarinus officinalis* L. sobre as cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Avaliou-se também a ação antibacteriana de soluções do OE sobre estes micro-organismos aderidos, por 12 h a 37 °C sob agitação, em superfície de polipropileno utilizada para corte de alimentos. As soluções sanitizantes de OE foram formuladas com base nos valores encontrados nas CBM, para cada estirpe bacteriana separadamente. A ação sanitizante da solução contra as células aderidas à superfície foi avaliada após 20 e 40 minutos de contato. Para *E. coli*, *S. Choleraesuis* e *P. aeruginosa*, o tempo de 20 minutos de contato foi suficiente para a remoção total das células aderidas, e para *S. aureus* houve redução significativa para ambos os períodos avaliados. O OE de alecrim pode ser considerado como alternativa natural para realizar o controle de bactérias patogênicas e contaminantes na indústria de alimentos.

**Palavras-chave.** adesão bacteriana, bactérias patogênicas, polipropileno, óleos voláteis, sanitizantes naturais, contaminação de alimentos.

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentrations (MBC) by using broth macro-dilution method in essential oil (EO) of *Rosmarinus officinalis* L. on the standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity of EO solutions on these bacteria adhered to the polypropylene surface used for cutting food was also evaluated, after 12 h at 37 °C under shaking on. The sanitizers EO solutions were formulated based on MBC findings, separately for each bacterial strain. The sanitizing action of the solutions on the bacterial cells-adhered surface was evaluated after being contacted for 20 and 40 min. For *E. coli*, *S. Choleraesuis* and *P. aeruginosa*, the contact for 20 min was sufficient for inducing complete elimination of adhered cells, and *S. aureus* populations were significantly reduced at both evaluated periods of time. The EO of *R. officinalis* may represent as natural alternative form to carry out the pathogenic and contaminants bacteria control in food industry.

**Keywords.** bacterial adhesion, pathogenic bacteria, polypropylene, volatile oils, natural sanitizers, food contamination.

## INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana em superfícies de contato é relevante na indústria de alimentos. Em condições favoráveis, células bacterianas podem aderir e reproduzir e, quando não completamente removidas, podem contribuir para a formação de biofilmes, os quais comprometem a qualidade e segurança dos alimentos<sup>1-3</sup>.

Na indústria de alimentos, os micro-organismos podem estar aderidos a resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, quando o processo de higienização dos materiais não seja aplicado corretamente. Células sésseis, presentes no biofilme, além de reduzir a eficiência e a vida útil de equipamentos, são mais resistentes ao processo de desinfecção. Além disso, as células podem se desprender e contaminar alimentos, promovendo prejuízos econômicos e risco de toxinfecções alimentares<sup>4</sup>.

A sanitização de equipamentos processadores de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada durante a produção. Limpeza e desinfecção são procedimentos que devem ser realizados regularmente, visto que eliminam grande parte dos micro-organismos contaminantes do equipamento. Todas as superfícies de processamento de alimentos são ambientes potenciais para a adesão bacteriana, que pode ocorrer até mesmo quando programas de higiene e sanitização são corretamente aplicados. Desse modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e tipos de superfícies<sup>5</sup>.

O crescente interesse em compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças nas atitudes dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de preservação de alimentos, detergentes e sanitizantes que possam causar impacto negativo ao ambiente<sup>6</sup>. A busca por novas substâncias capazes de controlar o crescimento bacteriano é atualmente uma área de pesquisa essencial para garantir a segurança alimentar.

A utilização de óleos essenciais (OE) tem sido uma alternativa promissora aos antimicrobianos utilizados na indústria de alimentos<sup>7</sup>. Os OE são compostos voláteis, naturais, complexos, caracterizados por um forte odor e são formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Caracterizados como lipofílicos, são capazes de atravessar a parede celular bacteriana e a membrana citoplasmática, rompendo a estrutura das

diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios<sup>8</sup>.

Tem-se destacado a utilização de substâncias naturais como o OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) para controle de contaminação microbiana. Essa planta é um arbusto aromático perene, pertencente à família Labiatae, com um metro de altura, ramos jovens que se tornam lenhosos ao maturar, e flores pequenas, agrupadas em densos ramos terminais. Os principais produtores são Itália, Iugoslávia, Espanha, Grécia, Turquia, França, Portugal, Egito e norte da África. Apesar de cultivada em quase todo o território brasileiro e importada como condimento para o consumo interno, poucos estudos têm sido realizados sobre essa importante planta medicinal para o controle de bactérias contaminantes de alimentos<sup>9</sup>.

As propriedades antioxidantes do alecrim podem ser atribuídas à presença de rosmanol, diterpenos rosmaridifenol e rosmariquinona, enquanto que as propriedades antimicrobianas parecem estar relacionadas com a presença de borneol, pinenos, cineol e cânfora<sup>9</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antibacteriana de soluções de OE de *Rosmarinus officinalis* L. para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* aderidos em superfície de polipropileno utilizada para corte de alimentos.

## MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes bacterianas avaliadas fazem parte da bacterioteca do laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708. O OE de *Rosmarinus officinalis* L. foi extraído na empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda., sendo que de acordo com o fornecedor, os componentes majoritários desse óleo foram 1,8-cineol (45,8 %), cânfora (13,9 %) e  $\alpha$ -pineno (12,4 %).

### Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CMI e da CBM do OE de *R. officinalis* L. foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio<sup>10</sup>. A CMI refere-

se à menor concentração do produto sanitizante capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, enquanto a CBM, à menor concentração capaz de causar a morte do micro-organismo<sup>11</sup>. Foram preparados 2,5 mL de soluções contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), *Tween* 80 a 0,8 % (v/v) e OE de *R. officinalis* L. com concentrações de 960, 480, 240, 120, 60, 30, 15, 7,5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Em seguida, 12,5  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada micro-organismo em cultura pura foram inoculadas em cada tubo com as concentrações testadas, sendo em seguida, homogeneizados e incubados a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, uma alçada da amostra dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida para placas contendo ágar caseína de soja (TSA), as quais foram então incubadas a 35 °C por 24 h para observação de crescimento microbiano<sup>10</sup>.

#### **Adesão bacteriana e formação de biofilmes em polipropileno**

Cupons de polipropileno, provenientes de placas utilizadas para corte de alimentos, com dimensões de 2,0 x 2,0 x 0,3 cm, foram previamente higienizados a 25  $\pm$  2 °C antes dos testes de adesão bacteriana e formação de biofilme: os cupons foram lavados em água potável e detergente neutro, posteriormente enxaguados com água destilada, sanitizados com álcool etílico 70 % (v/v), secos a 60 °C por 2 h e esterilizados a 121 °C por 15 min<sup>5</sup>.

Cinco cupons foram transferidos a erlenmeyer que continha 100 mL de caldo nutriente inoculado com cada suspensão bacteriana com população inicial de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Esse sistema foi mantido por 12 h a 37 °C sob agitação a 50 rpm<sup>12</sup>.

#### **Avaliação de células planctônicas em suspensão**

Para verificar o crescimento bacteriano em caldo nutriente após o final do tempo de adesão, realizou-se a quantificação das células planctônicas, portanto, não aderidas aos cupons de polipropileno. Para tanto, alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi submetida a diluições decimais seriadas, sendo que alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram plaqueadas por espalhamento superficial em TSA, e incubadas a 37 °C por 24 h, segundo *Compendium of Methods for the Examination of Foods*<sup>13</sup>.

#### **Efeito antibacteriano do OE sobre células bacterianas sésseis**

Após o período de adesão bacteriana de 12

h, os cupons com células sésseis, ou seja, aderidas ao polipropileno, de cada estirpe bacteriana foram tratados com soluções de OE de alecrim. Com o auxílio de pinça esterilizada, os cupons foram retirados da suspensão em caldo nutriente e imersos separadamente em solução salina 0,85 % para a remoção de células planctônicas<sup>14</sup>. Em seguida, foram imersos individualmente em solução contendo solução salina 0,85 % (m/v), *Tween* 80 a 0,8 % (v/v) e OE na concentração equivalente a CBM, previamente determinada. As soluções controle foram compostas pelos diluentes descritos acima sem o OE. A ação sanitizante da solução foi avaliada após 20 e 40 min de contato a 25 °C sob condições estáticas. Após o tratamento, as células bacterianas sobreviventes foram quantificadas.

#### **Quantificação de células aderidas**

O procedimento para quantificação das células sésseis nos cupons foi realizado após 12 h de adesão e também após o tratamento com as soluções de OE por 20 e 40 min. Cada cupom foi imerso separadamente em solução salina 0,85 % (m/v) para retirar as células planctônicas ou os resíduos da solução sanitizante<sup>14</sup>. Em seguida, foram transferidos separadamente para 10 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e sonicados por 2 min em banho de ultrassom Altsonic Clean 3IA (Alt<sup>®</sup>) com 40 kHz, para a remoção de células sobreviventes aderidas nas superfícies dos cupons<sup>15</sup>. A partir de 1000  $\mu\text{L}$  dessa solução, foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas, as quais foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem da população bacteriana presente e os resultados foram expressos em UFC.cm<sup>-2</sup>, segundo Careli et al<sup>16</sup>.

#### **Análises dos resultados**

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Para verificar o efeito antibacteriano do OE sobre as células sésseis, os valores de UFC.cm<sup>-2</sup> foram convertidos em escala logarítmica para atender a pressuposição de normalidade. Esse experimento foi realizado em esquemas de parcelas subdivididas, onde as soluções sanitizantes corresponderam às parcelas e os tempos de contato representaram às subparcelas. Todas as análises foram realizadas a 5 % de probabilidade com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS)<sup>17</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM)

Verificou-se que o crescimento de *S. aureus* foi inibido pela menor concentração do OE testada, 7,5  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  (Tabela 1). O OE apresentou efeito bactericida sobre todas as estirpes testadas, sendo necessárias concentrações de 15  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ , 120  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  e 120  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  para eliminar totalmente células de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*, respectivamente. *Pseudomonas aeruginosa* teve população eliminada quando submetida à solução a 960  $\mu\text{L}$  do OE. $\text{mL}^{-1}$  (Tabela 1), sendo este o micro-organismo que apresentou maior resistência às diferentes concentrações do OE de alecrim.

O potencial lipofílico dos componentes do OE desempenha importante papel sobre a camada lipídica da membrana celular bacteriana, causando perda da organização estrutural e integridade<sup>18</sup>. De acordo com Cox et al<sup>19</sup>, as diferenças na sensibilidade ao OE entre os micro-organismos podem ser atribuídas à variação na taxa de penetração das amostras através da parede da célula e nas estruturas da membrana celular.

Jiang et al<sup>20</sup> avaliaram a atividade antimicrobiana do OE de alecrim contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis*), bactérias Gram-negativas (*Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*). O OE de alecrim foi mais ativo contra todas as cepas bacterianas e também apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*. Os mesmos autores avaliaram as taxas de sobrevivência e alterações morfológicas de *S. aureus* após tratamento com diferentes concentrações

de OE por citometria de fluxo (FCM) e microscopia de força atômica (AFM). Os resultados indicaram que o OE em concentrações mais baixas, em contato com a superfície das células bacterianas, provocou irregularidades no formato celular tornando a superfície côncava. Foi constatado também que com o aumento da concentração do OE, as paredes celulares foram danificadas gradualmente e, em seguida, ocorreu extravasamento do conteúdo celular. Em estudo realizado por Gachkar et al<sup>21</sup>, o OE de alecrim apresentou atividade antimicrobiana sobre as estirpes *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, sendo *S. aureus* o micro-organismo mais resistente a ação do OE.

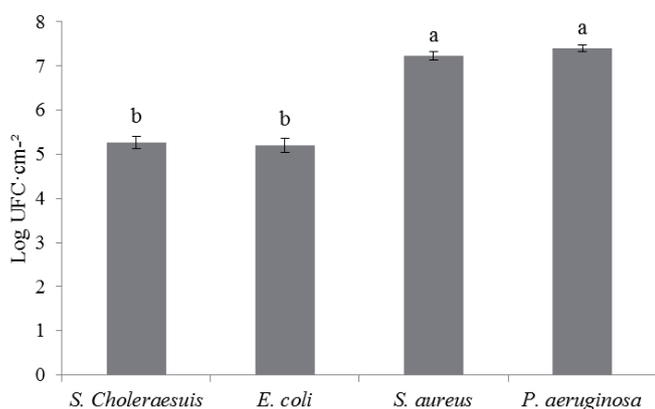
### Adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies de polipropileno

O inóculo inicial de cada estirpe bacteriana em caldo nutriente apresentou 5 log UFC. $\text{mL}^{-1}$  à temperatura ambiente, sendo que todas as estirpes bacterianas cresceram até 3 ciclos logarítmicos, obtendo-se concentração média de 8 log UFC. $\text{mL}^{-1}$  após o tempo final de adesão bacteriana.

A carga microbiana presente nas superfícies utilizadas na indústria de alimentos é um parâmetro importante, capaz de determinar se há formação de biofilme maduro ou somente adesão bacteriana. Segundo Andrade et al<sup>22</sup>, para ser considerado biofilme, é necessário no mínimo 10<sup>7</sup> UFC aderidas. $\text{cm}^{-2}$  de superfície. Neste estudo, constatou-se que *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentaram a mesma capacidade de formar biofilme em polipropileno, com contagens médias de 7,41 log UFC. $\text{cm}^{-2}$  e 7,23 log UFC. $\text{cm}^{-2}$ , respectivamente. Entretanto, o número de células de *E. coli* e *S. Choleraesuis* aderidas em polipropileno atingiram contagens médias de 5 log UFC. $\text{cm}^{-2}$  (Figura 1).

**Tabela 1.** Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

Micro-organismos	Concentração Mínima Inibitória	Concentração Bactericida Mínima
	( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )	( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	60	120
<i>Escherichia coli</i>	60	120
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	240	960



**Figura 1.** Concentrações médias de bactérias aderidas em superfície de polipropileno para cortes de carne, após 12 h a 37 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P > 0,05$ )

Pompermayer e Gaylarde<sup>23</sup> avaliaram a adesão de *S. aureus* e *E. coli*, em culturas mistas, em superfícies de polipropileno imersos em extrato aquoso preparado a partir de carcaça de frango de onde foram isolados, em temperaturas de 12 °C e 30 °C, por um tempo de até 8 h de incubação. Os autores verificaram que *E. coli* apresentou maior adesão nos cupons de polipropileno quando comparado a *S. aureus*, em ambas temperaturas. *E. coli* aderiu melhor a 30 °C, enquanto que células de *S. aureus* mostraram melhor adesão a 12 °C. Parizzi et al<sup>24</sup> avaliaram a adesão de *Listeria innocua* L6a e de *S. aureus* ATCC 6538 em cupons de aço inoxidável AISI 304, de policarbonato e de polipropileno. O número de células aderidas sobre as superfícies aumentou com o tempo de contato e a contagem obtida para os dois micro-organismos sobre as superfícies foi entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC.  $\text{cm}^{-2}$  após 12 horas de contato a 30 °C, independentemente do tipo da superfície estudada.

O biofilme bacteriano permite que os micro-organismos sobrevivam em ambientes diversos, sendo a sua fisiologia e comportamento diferentes das células planctônicas<sup>25</sup>.

### Remoção de células sésseis em polipropileno com o OE de alecrim

O estudo de novas ferramentas para o controle e eliminação de biofilmes bacterianos tornou-se um novo interesse de pesquisa, sendo a utilização de OE ou de seus constituintes majoritários uma das alternativas natural<sup>26</sup>.

A utilização de OE na remoção de biofilmes

bacterianos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos é alvo de estudos de diversos autores<sup>12,14,26</sup>. No entanto, ainda não foi relatada a utilização do OE de alecrim na sanitização de superfícies utilizadas no processamento de alimentos. Porém, há estudos com esse OE durante a sanitização de hortaliças minimamente processadas<sup>27</sup>, a utilização do extrato de alecrim como antimicrobiano oral contra bactérias planctônicas<sup>28</sup> e na inibição e controle de biofilmes fúngicos em superfícies acrílicas de próteses dentárias<sup>29</sup>.

A eficácia das soluções sanitizantes com OE de alecrim foi avaliada pela quantificação de células viáveis após a sanitização dos cupons de polipropileno contendo as células aderidas dos micro-organismos separadamente (Tabela 2).

As soluções sanitizantes de OE de alecrim foram preparadas nas concentrações encontradas nos testes da CBM. Observou-se que houve redução total das células aderidas nos cupons para *S. Choleraesuis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, não havendo diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de 20 e 40 min de contato com as soluções de OE. Verificou-se que 20 min de contato com as soluções sanitizantes nas concentrações avaliadas foram suficientes para a remoção total das células aderidas por esses micro-organismos sobre os cupons de polipropileno.

O tempo de sanitização com a solução de OE de alecrim influenciou na remoção do biofilme formado por *S. aureus* nos cupons. Um efeito de redução celular significativo ( $P < 0,05$ ) foi observado para tratamento sanitizante com maior tempo de contato. Após 40 min houve uma redução das células sobreviventes nos cupons em comparação com as células sobreviventes após 20 min.

O OE de *Rosmarinus officinalis* L. mostrou-se eficiente na sanitização das células aderidas de *S. Choleraesuis*, *E. coli* e no biofilme formado por *P. aeruginosa*. Neste trabalho foram escolhidos os valores da CBM de cada estirpe bacteriana para avaliar o efeito sanitizante frente a células sésseis em polipropileno, devido ao fato de que células em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos<sup>30-32</sup>. Há estudos que consideram que as células aderidas são 500 vezes<sup>30</sup> ou 1.000 vezes<sup>33</sup> mais resistentes que as células planctônicas aos mesmos agentes antimicrobianos. Isso indica que mecanismos determinantes dessas resistências podem diferir em células planctônicas e aderidas, e acredita-se que esses mecanismos sejam multifatoriais. Como, com a aplicação das soluções de OE de *Rosmarinus officinalis* L., foi observada a morte da população de *S. Choleraesuis*,

**Tabela 2.** Número de células aderidas em superfície de polipropileno, após 12 h a 37 °C, expresso em log UFC.cm<sup>-2</sup>, após tratamento com soluções contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L

Micro-organismos	Tempos de contato				CV (%)
	20 minutos		40 minutos		
	Controle	<i>R. officinalis</i>	Controle	<i>R. officinalis</i>	
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	4,69 A	0,00 B	4,30 A	0,00 B	8,54
<i>Escherichia coli</i>	4,50 A	0,00 B	4,25 A	0,00 B	6,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,17 A	6,88 B	6,93 AB	6,52 C	1,84
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,30 A	0,00 B	7,18 A	0,00 B	2,83

Médias seguidas na mesma linha por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Coeficiente de variação (CV)

*E. coli* e *P. aeruginosa* em polipropileno, testes adicionais devem ser realizados com a finalidade de encontrar concentrações inferiores das utilizadas ou próximas da CMI, que possuam o mesmo efeito sanitizante.

A solução de OE na concentração 7,5 µL.mL<sup>-1</sup> não foi suficiente para a remoção total das células de *S. aureus* na superfície dos cupons de polipropileno, mesmo que observada uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) de células sobreviventes viáveis com um maior tempo de contato (Tabela 2). Concentrações superiores devem ser avaliadas para se obter a eliminação total do biofilme formado por estes micro-organismos.

Segundo Simões et al<sup>25</sup>, a sanitização é a utilização de produtos com ação antimicrobiana com a finalidade de eliminar micro-organismos. O objetivo é reduzir células viáveis restantes na superfície após a limpeza e evitar o crescimento microbiano na superfície antes de reiniciar a produção. O produto sanitizante deve ser eficaz, seguro, de fácil manipulação, e facilmente removido das superfícies, sem deixar resíduos que poderiam prejudicar a saúde e as propriedades sensoriais dos produtos finais.

## CONCLUSÃO

As soluções sanitizantes formuladas com o óleo essencial de alecrim mostraram-se eficientes na redução das células aderidas nas superfícies dos cupons de polipropileno após os tratamentos. Isso indica que a utilização desse óleo essencial pode ser uma nova alternativa para a remoção de células aderidas e na forma de biofilmes em superfícies de processamento na indústria de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPEMIG, CAPES e PRPq/UFMG.

## REFERÊNCIAS

1. Bower CK, Mc Guire J, Daeschel MA. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends Food Sci Technol*.1996;7(5):152-7.
2. Zottola EA. Special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In: Tortorello ML, Gendel SM. *Food Microbial Analysis: new technologies*. IFT basic symposium series. New York: Marcell Dekker; 1997. Cap.16, p.315-46.
3. Zottola EA, Sasahara, KC. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *Int J Food Microbiol*.1994;23(2):125-48.
4. Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(3):277-84.
5. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol*.2000;61(1):81-5.
6. Lebert I, Leroy S, Talon R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiol*.2007;24(3):281-7.
7. Brugnera DF, Oliveira MMM, Piccoli RH. Essential oils of *Cymbopogon* sp. in the control of foodborne pathogenic bacteria. *Alim Nutr*.2011;22(3):339-43.
8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*.2008;46(2):446-75.
9. Porte A, Godoy RLO. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. *Bol CEPPA*.2001;19(2):193-210.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. 6ª ed. Norma NCCLS M7-A6; 2003.
11. Pozzo MD, Viegas J, Santurio DF, Rossatto L, Soares IH, Alves SH, et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente à *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. *Cienc Rural*.2011;41(4):667-72.
12. Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*.2010;21(4):549-53.
13. American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21ª ed. Washington: American Water Works, Water Environment Federation; 2005.
14. Valeriano C, Oliveira TL, Carvalho SM, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*.2012;25(2):673-7.
15. Malheiros PS, Passos CT, Casarin LS, Serraglio L, Tondo EC. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*.2010;21(3):298-301.
16. Careli RT, Andrade NJ, Soares NF, Júnior JIR, Rosado MS, Bernardes PC. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. *Cienc Tecnol Aliment*.2009;29(1):171-6.
17. Statistical Analysis System (SAS). SAS/ETS user's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute; 2010.
18. Aiensaard J, Aiumlamai S, Aromde C, Suwimol T, Khunkitti W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res Vet Sci*.2011; 91(3):e31-7.
19. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*.2000;88(1):170-5.
20. Jiang Y, Wu N, Fu Y, Wang W, Luo M, Zhao C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ Toxicol Pharmacol*.2011;32(1):63-8.
21. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*.2007;102(3):898-904.
22. Andrade NJ, Bridgman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot*.1998;61(7):833-8.
23. Pompermayer DMC, Gaylarde CC. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol*.2000;17(4):361-5.
24. Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva CAS, Soares NFF, Silva EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol*.2004;47(1):77-83.
25. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Sci Technol*.2010;43(4):573-83.
26. Oliveira MMM, Brugnera DF, Nascimento JA, Piccoli RH. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. *Food Bioprod Proc*.2012;90(4):809-18.
27. Azerêdo GA. Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas [tese de doutorado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2011. 135 pp.
28. Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Rev Bras Farmacogn*.2008;18(2):236-40.
29. Cruzeiro MES. Produção e quantificação do biofilme de *Candida albicans* em resinas acrílicas tratadas com extratos vegetais [dissertação de mestrado]. Pelotas, Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Pelotas, 2013. 91 pp.
30. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber R, Lappin-Scott HM. Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol*.1995;49:711-45.
31. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*.2002;8(9):881-90.
32. Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeterior Biodegrad*.2003;51(4):249-53.
33. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*.2003;5(13):1213-9.