

# Sobrevivência de patógenos de origem alimentar aderidos em aço inoxidável após aplicação de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*

## Survival of foodborne pathogens adhered to the stainless steel after applying the *Cymbopogon flexuosus* essential oil

RIALA6/1660

Gleyca Ferreira de BARROS, Camila Ribeiro ROCHA\*, Roberta Torres CARELI, Francielle Patrícia Evangelista MENDES, Anna Christina de ALMEIDA, Eduardo Robson DUARTE, Diogo França ARRUDA

\*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: camilaribeirorocha@yahoo.com.br

Recebido: 09.07.2015 - Aceito para publicação: 22.09.2015

### RESUMO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon flexuosus* sobre as estirpes padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis* aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 #4. Inicialmente, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) do OE foram determinadas pela técnica de macrodiluição em caldo. Posteriormente, a adesão e a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável foram avaliadas por 15 h a 37 °C sob agitação, e a ação sanitizante do OE contra as células aderidas nos cupons após 20 e 40 min de contato. O valor da CIM encontrada para todas as espécies foi de 7,5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e esta concentração foi utilizada para o preparo da solução sanitizante. Após ambos os períodos de sanitização constatou-se a remoção total das células aderidas para as espécies de *E. coli* e *S. Choleraesuis*. Não foi possível eliminar as células aderidas de *S. aureus*, contudo, houve uma redução quando comparada ao número de células aderidas antes de serem submetidas aos tratamentos de sanitização. O OE de *C. flexuosus* pode ser uma alternativa no controle microbiano em superfícies durante o processamento de alimentos.

**Palavras-chave.** segurança alimentar, capim-limão, adesão bacteriana, ação antimicrobiana.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of different concentrations of essential oil (EO) of *Cymbopogon flexuosus* on the standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella Choleraesuis* adhered to the stainless steel surface AISI 304 #4. Initially, the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined by means of EO macrodilution broth assay. Subsequently, the adhesion and the biofilm formation on stainless steel surface were evaluated for 15 h at 37 °C under agitation, and also the OE sanitizing action against adherent cells on the coupons after 20 and 40 min of contact. The MIC value found for all species was 7.5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , which is the concentration used for preparing the sanitizing solution. A complete removal of adhered cells of *E. coli* and *S. Choleraesuis* occurred after being exposed during both periods of time. The adhered cells of *S. aureus* were not removed; however, a reduction in the number of adhered cells was detected when compared to that quantity showed before being subjected to sanitizing treatments. The EO of *C. flexuosus* might be an alternative for microbial control in surfaces during food processing.

**Keywords.** food safety, lemongrass, bacterial adhesion, antimicrobial action.

## INTRODUÇÃO

Na indústria processadora de alimentos, um dos problemas que pode ocorrer quando alguns cuidados higiênico-sanitários não são realizados corretamente, está relacionado à contaminação bacteriana, que pode ocasionar a deterioração dos alimentos contaminados, a redução da vida de prateleira destes alimentos e, além disso, causar problemas na saúde do consumidor<sup>1</sup>.

Segundo Milezzi<sup>2</sup>, biofilmes bacterianos possuem resistência maior a processos de higienização quando comparada às células dispersas e livres presentes em superfície. Por isso, a higienização deve ser realizada periodicamente para evitar que células planctônicas se multipliquem e formem biofilmes.

O processo de higienização de equipamentos nas indústrias inclui a limpeza e a sanitização, por meio da aplicação de diversos produtos, com objetivo de eliminar micro-organismos, resíduos orgânicos e minerais aderidos à superfície<sup>3</sup>. O agente sanitizante utilizado deve ser bem selecionado, levando em conta sua ação antimicrobiana, alteração das características sensoriais dos alimentos, segurança no manuseio, estabilidade da solução, corrosões nos equipamentos e desenvolvimento de compostos indesejáveis<sup>4</sup>.

Vários estudos já foram realizados com óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, devido às suas propriedades antimicrobianas, com a finalidade de elaborar sanitizantes naturais para controlar o crescimento microbiano, em substituição a agentes sintéticos, detergentes e sanitizantes que provocam impactos negativos ao ambiente. Aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, sendo que cerca de 300 são importantes para as indústrias farmacêuticas, agrônomicas, de alimentos, de cosméticos e perfumaria<sup>5</sup>. Dentre estes, destaca-se o óleo essencial (OE) de *Cymbopogon flexuosus*, conhecido comercialmente como

*lemongrass* e popularmente como capim-limão da Índia Oriental<sup>6</sup>.

A ação antibacteriana dos óleos essenciais ocorre devido a seus compostos e pela característica lipofílica de suas moléculas, que lhes confere a capacidade de interagir e atravessar a parede celular das bactérias; o óleo essencial adere à membrana citoplasmática e altera moléculas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios presentes na membrana, promovendo aumento da permeabilidade da membrana<sup>7</sup>, cuja expansão e fluidez, associada à exposição ao óleo essencial, pode ocasionar a perda de vários compostos celulares, como íons, DNA e proteínas, e levar à morte celular<sup>8</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antibacteriana do OE de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis*, aderidos sobre superfícies de aço inoxidável.

## 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, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708. Essas culturas foram mantidas em tubos com tampa apegada com capacidade de 1 mL, contendo BHI e glicerol a 30 % mantidos a -20 °C. Para o preparo das suspensões, a cultura foi ativada por duas vezes consecutivas em 10 mL de caldo BHI e incubada a 37 °C por 24 h, obtendo-se uma concentração final de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

O OE de *Cymbopogon flexuosus* foi extraído na empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda e, de acordo com o fornecedor, os componentes majoritários desse óleo foram neral (34,3 %) e geranial (44,6 %).

### **Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM)**

A determinação da CIM e da CBM do OE de *C. flexuosus* 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 aeróbico<sup>9</sup>.

Foram preparadas 2,5 mL de soluções contendo caldo BHI, *Tween* 80 e OE com concentrações de 7,5; 15; 30; 60; 120; 240; 480; 960  $\mu\text{L.mL}^{-1}$ . Em seguida, a cada tubo foram adicionados 12,5  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada micro-organismo, separadamente. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 35 °C por 24 h, sendo que após o período de incubação, uma alçada dos meios de cultura que não apresentaram turvação foi transferida para a superfície de placas contendo ágar caseína de soja (TSA), as quais foram incubadas a 35 °C por 24 h, para observar eventual crescimento microbiano e determinar a CBM.

### **Adesão bacteriana e formação de biofilmes em aço inoxidável**

Cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 com dimensões de 2,0 x 2,0 x 0,1 cm, foram lavados em água potável e detergente neutro; em seguida, foram enxaguados com água destilada, sanitizados com álcool etílico 70 % (v/v), secos a 60 °C por 2 h e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min<sup>10</sup>.

Cinco cupons foram transferidos para erlenmeyer contendo 99 mL de caldo nutriente inoculado com 1 mL de suspensão bacteriana de modo a obter uma concentração celular de  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, para cada sistema experimental. Esse sistema foi mantido por 15 h a 37 °C sob agitação a 50 rpm, em mesa agitadora orbital<sup>11</sup>. O procedimento foi repetido para cada micro-organismo teste.

Após o período de tratamento para adesão, realizou-se a quantificação de células planctônicas, portanto, não aderidas aos cupons de aço inoxidável. Para tanto, alíquotas de 1000  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram submetidas a diluições decimais seriadas e,

100  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi plaqueado por espalhamento em superfície de TSA e incubado a 37 °C por 24 h, segundo *Compendium of Methods for the Examination of Foods*<sup>12</sup>.

### **Efeito antibacteriano do OE sobre as células aderidas**

Após 15 h de adesão bacteriana, com auxílio de uma pinça esterilizada, os cupons foram retirados do contato com a suspensão bacteriana e imersos separadamente em solução salina a 0,85 % (m/v) por 1 min, para a remoção das células não aderidas à superfície de aço inoxidável. Em seguida, os cupons foram submetidos aos tratamentos com OE de capim limão, sendo transferidos a tubos contendo solução salina a 0,85 % (m/v) adicionada de 0,8 % de *Tween* 80 e volume adequado de OE para obter 10 mL de solução com concentração final equivalente a CIM determinada previamente, sendo mantidos em contato com a solução por 20 e 40 min de contato, a 25 °C sob condições estáticas, para avaliar a ação sanitizante do OE. Após o tratamento, as células bacterianas sobreviventes foram quantificadas.

O procedimento foi realizado com solução controle, composta pelos mesmos diluentes descritos, porém sem a adição do OE.

### **Quantificação de células aderidas**

A quantificação das células sésseis nos cupons foi realizada após o período de 15 h para a adesão, assim como após a exposição por 20 e 40 min ao OE e à solução controle.

Cada cupom foi imerso, separadamente, em solução salina 0,85 % (m/v) para retirar células planctônicas e/ou resíduos da solução sanitizante<sup>13</sup>. Em seguida, cada cupom foi transferido para 10 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e sonicado por 2 min em banho de ultrassom Altsonic Clean 3IA (Alt\*) com 40 kHz, para remover as células sobreviventes aderidas nas superfícies dos cupons. 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>14</sup>.

### Análise estatística

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>15</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Verificou-se que 7,5 µL.mL<sup>-1</sup> foi a menor concentração de OE de capim-limão capaz tanto de inibir o crescimento bacteriano, como provocar a morte, para as três cepas utilizadas.

Adukwu et al<sup>16</sup> avaliaram a CIM e CBM do OE de *C. flexuosus*, pela técnica de microtitulação em placas de 96 poços, sobre cinco cepas de *S. aureus* de origem hospitalar e encontraram CIM de 0,06 % (v/v) e CBM de 0,125 % (v/v) para todas as cepas avaliadas.

Brugnera, Oliveira e Piccoli<sup>17</sup> demonstraram atividade antibacteriana do OE de *C. citratus* (capim-limão) frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo encontrado CIM de 3,90 µL.mL<sup>-1</sup> para todas as cepas analisadas.

As variações dos valores da CIM e CBM encontrados nos diversos estudos podem ser justificadas pela diferença da técnica aplicada, do micro-organismo estudado, da espécie da planta e pelas características do óleo utilizado<sup>18</sup>.

### Adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável

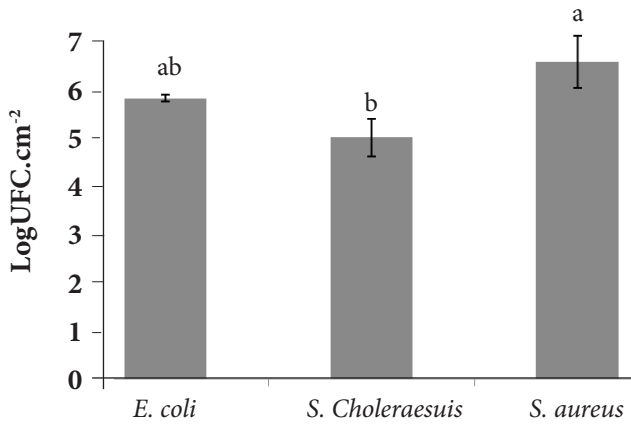
As concentrações das células planctônicas em Caldo Nutriente tiveram um aumento de até três ciclos logarítmicos após 15 h a 37 °C, tendo sido obtida população média de 8 logUFC.mL<sup>-1</sup>.

Segundo Andrade, Bridgman e Zottola<sup>19</sup>, os micro-organismos em suspensão quando entram em contato com uma superfície podem se aderir e até formar biofilmes e, de acordo com Oulahal et al<sup>20</sup>, micro-organismos em estado planctônico podem receber algum estímulo que os levam a aderir a superfícies. Embora esse processo necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciá-lo foram descritos, como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença de compostos orgânicos e inorgânicos e temperatura.

Neste estudo, diferentes graus de adesão aos cupons de aço inoxidável foram observados. Verificou-se que *S. aureus* apresentou maior capacidade de adesão, atingindo contagem média de 6,11 log UFC.cm<sup>-2</sup> ( $p < 0,05$ ), seguido de *E. coli* e *S. Choleraesuis* (Figura 1). Apesar das diferenças constatadas na adesão, verificou-se elevada concentração de células aderidas, sendo preocupante para a indústria de alimentos, tanto pelo fato destes micro-organismos serem classificados como patogênicos e oferecerem risco à saúde, como pelo fato do número elevado de células sésseis poder dificultar o procedimento de sanitização das superfícies e permitir a transferência de contaminação microbiana para outras áreas e equipamentos<sup>19</sup>.

Segundo Andrade, Bridgman e Zottola<sup>19</sup>, para ser considerado biofilme, é necessária a adesão no mínimo de 10<sup>7</sup> UFC.cm<sup>-2</sup> de superfície. Considerando isso, neste estudo verificou-se a adesão bacteriana em aço inoxidável, porém não houve a formação de biofilme por *S. aureus*, *E. coli* e *S. Choleraesuis*.

Brabes<sup>21</sup> constatou contagens de *Staphylococcus* spp. entre 5,75 a 6,01 logUFC.cm<sup>-2</sup> em aço inoxidável após 24 h de incubação a 30 °C, enquanto Boari et al<sup>22</sup> observaram que, após 10 dias, o número de células de



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $p > 0,05$ )

**Figura 1.** Quantidade média de células bacterianas aderidas em cupons de aço inoxidável, após de 15 h de incubação a 37 °C sob agitação

*S. aureus* aderidas a superfície de aço inoxidável e cultivadas em leite desnatado atingiram  $1,7 \times 10^8$  UFC.cm<sup>-2</sup>;  $2,5 \times 10^7$  UFC.cm<sup>-2</sup> e  $3,7 \times 10^4$  UFC.cm<sup>-2</sup> a 18 °C, 7 °C e 4 °C, respectivamente, demonstrando que a temperatura é um fator determinante no desenvolvimento microbiano, e como tal, pode afetar a adesão bacteriana e a formação de qualquer biofilme.

### Ação do OE de *C. flexuosus* na remoção de células bacterianas aderidas em aço inoxidável

A concentração do OE de capim-limão utilizada foi  $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ , determinada pelo teste da CIM, sendo que sua ação sanitizante frente às espécies bacterianas pôde ser observada a partir da contagem de células viáveis após a exposição dos cupons de aço inoxidável, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Constatou-se que o OE de *C. flexuosus* reduziu totalmente o número de células sésseis de *E. coli* e *S. Choleraesuis* dos cupons de aço inoxidável, não tendo sido verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de 20 e 40 min de contato. Nesse caso, o mais viável é utilizar o menor tempo de contato para a sanitização da superfície (Tabela 1).

Entretanto, para *S. aureus*, a solução sanitizante provocou somente a redução no número de células aderidas ( $P < 0,05$ ), contudo sem sua eliminação. Esse fato é um agravante, pois biofilmes podem se tornar fortemente aderidos as superfícies e, posteriormente partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios<sup>23</sup>. Observou-se maior eficiência na redução da concentração celular de *S. aureus* aderida após 40 min de contato com o sanitizante ( $p < 0,05$ ); porém a contagem de células sobreviventes permaneceu

**Tabela 1.** População bacteriana aderida na superfície de aço inoxidável, em log UFC.cm<sup>-2</sup>, após exposição à solução de  $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$  OE de *Cymbopogon flexuosus* e à solução controle

Micro-organismos	Tempo de contato				CV (%)
	20 minutos		40 minutos		
	Controle	<i>C. flexuosus</i>	Controle	<i>C. flexuosus</i>	
<i>E. coli</i>	3,43aA	0,00bB	3,45aA	0,00bB	14,39
<i>S. Choleraesuis</i>	3,27aA	0,00bB	3,17aA	0,00bB	8,26
<i>S. aureus</i>	5,91aA	5,79bA	6,08aB	5,05bB	7,99

Médias seguidas na mesma linha por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade; letras maiúsculas referem-se aos tempos de contato e letras minúsculas referem-se aos tratamentos (sanitização com OE e solução controle); CV: Coeficiente de variação



alta, considerando tratar-se de uma espécie bacteriana patogênica.

Nas condições deste estudo, a solução sanitizante contendo OE de *C. flexuosus* a  $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$  foi considerada eficiente na remoção de células de *E. coli* e *S. Choleraesuis* aderidas aos cupons, entretanto, como houve a recuperação células viáveis de *S. aureus* aderidas ao aço inoxidável após os tratamentos, pode-se constatar uma maior resistência dessa espécie ao OE. Segundo Chavant et al<sup>24</sup>, micro-organismos em biofilmes são considerados mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver após processo de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com conseqüentes perdas econômicas e vinculação de doenças alimentares.

De acordo com McDonnell e Russel<sup>25</sup>, a resistência de micro-organismos a agentes sanitizantes pode ser uma característica própria do micro-organismo ou adquirida por mutação mediada por plasmídios ou transposons. Sander et al<sup>26</sup> indicam que as bactérias, quando entram em contato com desinfetantes por um período prolongado, podem desenvolver resistência e bactérias do mesmo gênero e espécie podem apresentar diferentes graus de sensibilidade a um desinfetante.

Valeriano et al<sup>13</sup> verificaram que o óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) foi eficiente na remoção de células aderidas e biofilmes formados por *Salmonella* Enterica, após 240 h a 37 °C em superfície de aço inoxidável. Esses autores demonstraram que a solução com óleo essencial de capim-limão na concentração  $7,8 \mu\text{L.mL}^{-1}$ , após 10 min de exposição, foi capaz de reduzir a contagem de células aderidas de  $4,20 \log \text{UFC.cm}^{-2}$  para  $3,56 \log \text{UFC.cm}^{-2}$  e, após 20 e 40 min de tratamento, conseguiu remover totalmente as células aderidas nos cupons de aço inoxidável.

Oliveira et al<sup>11</sup> observaram a ação do OE de capim-limão sobre biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* por um período de 3 e 240 h em aço inoxidável. Notaram que,

após 15 e 60 min de contato da solução do óleo essencial com a superfície dos cupons não ocorreu remoção total dos biofilmes formados, mas ocorreu uma redução significativa na contagem de células.

Millezi et al<sup>2</sup> utilizaram solução de hidróxido de sódio juntamente com óleo essencial de capim-limão com concentração de  $31 \mu\text{L.mL}^{-1}$  para remoção de biofilmes formados por *Aeromonas hydrophila* em aço inoxidável; esta solução detergente sanitizante reduziu a população bacteriana, sendo que obtiveram menores valores de  $\log \text{UFC.cm}^{-2}$  em comparação ao biofilme maduro sem tratamento.

## CONCLUSÃO

As soluções preparadas com OE de capim-limão foram capazes de inibir o crescimento das espécies bacterianas analisadas e as soluções sanitizantes contendo o OE, na concentração de  $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ , mostraram ser eficientes na redução de células bacterianas aderidas em aço inoxidável AISI 304#4.

A aplicação de soluções contendo óleo essencial de *C. flexuosus* em procedimentos de higienização pode ser uma alternativa para o controle de bactérias patogênicas aderidas às superfícies de aço inoxidável de equipamentos e utensílios envolvidos no processamento de alimentos. Contudo, são necessários testes toxicológicos para avaliar o efeito nocivo desse produto na concentração sugerida neste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPEMIG, CAPES e PRPq/UFGM.

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira DCV. Produção de biofilmes por *Salmonella* sp. isolada de frango [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2011.
2. Millezzi AF. Ação de óleos sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [tese de doutorado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2012.

3. Rossi ACR, Porto E. A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes. *SBC*.2009;março/abril:40-1.
4. Nascimento HM, Delgado DA, Barbaric IF. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Rev Ceciliana*.2010;2(1):11-3.
5. 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. [DOI: 10.1016/j.fm.2006.04.011].
6. May A, Bovi AO, Maia NB, Moraes ARA, Pinheiro MQ, Mario M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. *Hortic Bras*.2008;826(3):379-82. [DOI: 10.1590/S0102-05362008000300017].
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*.2008;46(2):446-75. [DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106].
8. Oliveira MMM. Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Echerichia coli* enteropatogênica [tese de doutorado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2011.
9. 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.
10. 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. [DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00369-X].
11. 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. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.08.003].
12. American Public Health Association – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21ª ed. Washington: American Water Works, Water Environment Federation; 2005.
13. 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. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.12.015].
14. 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. [DOI: 10.1590/S0101-20612009000100026].
15. Statistical Analysis System – SAS. SAS/ETS user's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute; 2010.
16. Adukwu EC, Allen SCH., Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*.2012;113(5):1217-27. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x].
17. 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.
18. Fennell CW, Lindsey K L, Mc Gaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J Ethnopharmacol*.2004;94(2-3):205-17. [DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.012].
19. 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.

20. Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropilene and stainless steel in contact with three different dairy products. Food Control. 2008;19(2):178-85. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.03.006].
21. Brabes KCS. Identificação de capacidade de adesão de *Staphylococcus* spp. isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambientes de uma indústria de laticínios [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2005.
22. Boari CA, Alves MP, Tebaldi VM, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. Cienc Tecnol Aliment.2009;29(4):886-95.
23. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int J Food Microbiol.2001;64(3):367-72. [DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00466-9].
24. Chavant P, Martinie BG, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods. 2007;68(3):605-12. [DOI: 10.1016/j.mimet.2006.11.010].
25. McDonnel G, Russel, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev.1999;12(1):147-79.
26. Sander JE, Hofacre CL, Cheng IH, Wyatt RD. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. Avian Dis.2002;46(4):997-1000.