

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 reproduzirem e, quando não completamente removidas, podem contribuir para a formação de biofilmes, os quais comprometem a qualidade e segurança dos alimentos¹⁻³.

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 alimentares⁴.

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 superfícies⁵.

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 ambiente⁶. 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 alimentos⁷. 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 fosfolípidios⁸.

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 lenhosas 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 alimentos⁹.

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 cânfora⁹.

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 α -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 aeróbio¹⁰. 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-organismo¹¹. 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 μL 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 microbiano¹⁰.

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 min⁵.

Cinco cupons foram transferidos a erlenmeyer que continha 100 mL de caldo nutriente inoculado com cada suspensão bacteriana com população inicial de 10⁵ UFC.mL⁻¹. Esse sistema foi mantido por 12 h a 37 °C sob agitação a 50 rpm¹².

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 μL de cada amostra foi submetida a diluições decimais seriadas, sendo que alíquotas de 100 μL foram plaqueadas por espalhamento superficial em TSA, e incubadas a 37 °C por 24 h, segundo *Compendium of Methods for the Examination of Foods*¹³.

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 planctônicas¹⁴. 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 sanitizante¹⁴. 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[®]) com 40 kHz, para a remoção de células sobreviventes aderidas nas superfícies dos cupons¹⁵. A partir de 1000 μL 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⁻², segundo Careli et al¹⁶.

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⁻² 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)¹⁷.

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 μL do OE. 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 integridade¹⁸. De acordo com Cox et al¹⁹, 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 al²⁰ 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 al²¹, 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. mL^{-1} à temperatura ambiente, sendo que todas as estirpes bacterianas cresceram até 3 ciclos logarítmicos, obtendo-se concentração média de 8 log UFC. 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 al²², para ser considerado biofilme, é necessário no mínimo 10⁷ UFC aderidas. 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. cm^{-2} e 7,23 log UFC. cm^{-2} , respectivamente. Entretanto, o número de células de *E. coli* e *S. Choleraesuis* aderidas em polipropileno atingiram contagens médias de 5 log UFC. 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

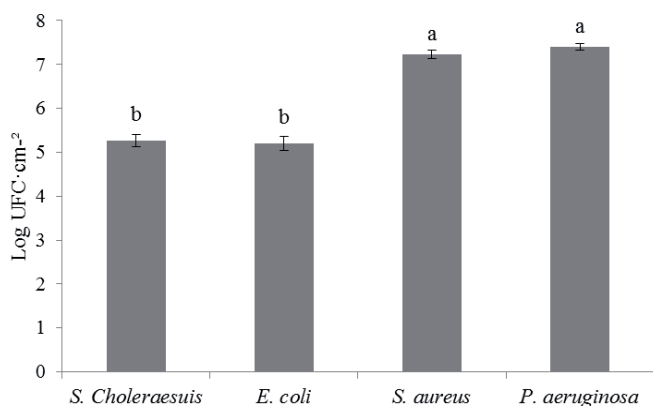


Figura 1. Concentrações médias de bactérias aderidas em superfície de polipropileno para cortes de carne, após 12 h a 37 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P > 0,05$)

Pompermayer e Gaylarde²³ 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 al²⁴ 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 10⁵ e 10⁶ UFC. 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 planctônicas²⁵.

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 natural²⁶.

A utilização de OE na remoção de biofilmes

bacterianos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos é alvo de estudos de diversos autores^{12,14,26}. 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 processadas²⁷, a utilização do extrato de alecrim como antimicrobiano oral contra bactérias planctônicas²⁸ e na inibição e controle de biofilmes fúngicos em superfícies acrílicas de próteses dentárias²⁹.

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 antimicrobianos³⁰⁻³². Há estudos que consideram que as células aderidas são 500 vezes³⁰ ou 1.000 vezes³³ 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⁻², 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⁻¹ 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 al²⁵, 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.