



AÇÃO BACTERICIDA DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *BACILLUS CEREUS*

Bactericidal action of essential oils major compounds on planktonic and sessile Bacillus cereus cells

Bruna A. Balduino^{1*}, Anderson Henrique Venâncio², Michelle C. Gonçalves³, Juliana J. Pinelli⁴, Roberta H. Piccoli⁵

RESUMO: *Bacillus cereus* é uma bactéria patogênica associada à toxinfecções alimentares, capaz de formar biofilmes sobre superfícies de processamento de alimentos. Uma alternativa para controlar o crescimento de *B. cereus* nas indústrias de alimentos são os óleos essenciais e ou seus componentes majoritários, compostos naturais com propriedades antibiofilmes. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação bactericida dos componentes majoritários de óleos essenciais, cinamaldeído, citral e carvacrol, e suas combinações sobre células planctônicas e sésseis de *B. cereus* ATCC 14579. A concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos majoritários sobre as células planctônicas foi determinada empregando-se a técnica de macrodiluição em caldo BHI, avaliando-se concentrações entre 0,016 a 2%. A concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB) foi determinada após a formação dos biofilmes de *B. cereus* em microplaca de poliestireno por 72 h a 37 °C. Os biofilmes foram expostos à soluções dos componentes majoritários nas concentrações de 0,016 a 2% por 20 min. As combinações entre os componentes majoritários foram realizadas empregando-se o planejamento experimental de mistura simplex-centróide. As CMB sobre as células planctônicas de *B. cereus* dos três componentes avaliados foram iguais a 0,0625%, já para as células sésseis as CMBB variaram, sendo de 1% para cinamaldeído e citral e 2% para o carvacrol. Todas as combinações testadas inibiram o crescimento das células planctônicas. No entanto, para as células sésseis, somente 5 combinações foram eficazes. Os resultados comprovam a ação bactericida dos compostos testados e seu potencial para ser utilizado como conservante ou sanitizante natural na indústria alimentícia.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais. Biofilmes. Cinamaldeído. Citral.

ABSTRACT: *Bacillus cereus* is a pathogenic bacterium associated with foodborne infections, capable of forming biofilms on food processing surfaces. The alternative to control the growth of *B. cereus* in the food industries are essential oils and or their major components, natural compounds with antibiofilm properties. Thus, the objective of the work was to evaluate the bactericidal action of the major components of essential oils, cinnamaldehyde, citral and carvacrol, and their combinations on planktonic and sessile cells of *B. cereus* ATCC 14579. The minimum bactericidal concentration (MBC) of the majority compounds on planktonic cells was determined using the macrodilution technique in BHI broth, evaluating concentrations between 0,016 to 2%. The minimum bactericidal concentration of the biofilm (MBCB) was determined after the formation of *B. cereus* biofilms in a polystyrene microplate for 72 h at 37 °C. Biofilms were exposed to solutions of the major components in concentrations of 0,016 to 2% for 20 min. The combinations between the major components were performed using the experimental planning of the simplex-centroid mixture. The MBC on the *B. cereus* planktonic cells of the three components evaluated were equal to 0,0625%, while for sessile cells the MBCB varied, being 1% for cinnamaldehyde and citral and 2% for carvacrol. All tested combinations inhibited the growth of planktonic cells. However, for sessile cells, only 5 combinations were effective. The results prove the bactericidal action of the tested compounds and their potential to be used as a natural preservative or sanitizer in the food industry.

Keywords: Natural antimicrobials. Biofilms. Cinnamaldehyde. Citral.

*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

¹Mestranda em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG; (35) 99874-1724, brunaazevedo.94@hotmail.com

²Mestrando em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras (UFLA), anderson123dfgh21@gmail.com

³Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras (UFLA), michellemicroagricola@gmail.com

⁴Doutoranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras (UFLA), jujjpinelli@gmail.com

⁵Professora Titular, Universidade Federal de Lavras (UFLA), rhpiccoli@ufla.br

INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma bactéria causadora de toxinfecções alimentares com morfologia de bastonete, formadora de esporos, Gram-positiva e aeróbia facultativa. Esse microrganismo possui a capacidade de causar dois tipos de enfermidades gastrointestinais, sendo elas a síndrome emética, devido à ingestão de toxinas formadas no alimento e a síndrome diarreica, ocasionada pela ingestão de células viáveis presentes no alimento. Além disso, devido a sua capacidade de esporular e formar biofilmes sobre diversas superfícies, pode causar problemas de segurança alimentar, sendo de grande preocupação para a indústria alimentícia (BHUNIA, 2008; HUANG et al., 2020).

A adesão de microrganismos em superfícies de contato com alimentos leva à formação de biofilmes que são responsáveis por danificar equipamentos, deteriorar os alimentos e ou causar doenças (YUAN et al., 2020). Os biofilmes bacterianos, presentes em superfícies de equipamentos e ou utensílios, são fonte constante de microrganismos para os alimentos e quando esses são patogênicos causarão problemas de saúde pública. Além disso, *B. cereus* tem a capacidade de secretar, dentro do biofilme, uma vasta gama de metabólitos como enzimas, lipases e proteases que resultarão em alterações sensoriais dos alimentos (PINTO et al., 2017) e toxinas que podem agir no próprio biofilme e ou no ambiente (GALIÉ et al., 2018).

Diante dos problemas que os microrganismos podem causar, tanto para a indústria, quanto para o consumidor, várias formas de controle desses microrganismos são utilizadas destacando-se o processo de higienização e a utilização de conservantes.

Os conservantes podem eliminar os microrganismos ou inibir sua proliferação, reduzindo o processo de deterioração durante as etapas de produção, transporte e comercialização (JU et al., 2019). Esses conservantes podem ser sintéticos ou naturais, sendo os sintéticos os mais utilizados pela indústria de alimentos. No entanto, há o interesse cada vez maior em alternativas naturais que sejam eficientes, uma vez que o uso de conservantes químicos tem sido relacionado à carcinogenicidade, teratogenicidade e intoxicação alimentar (JU et al., 2017).

Para prevenir ou eliminar o desenvolvimento e adesão de biofilmes nas tubulações e superfícies de processamento de alimentos, a indústria normalmente utiliza métodos químicos de baixo custo como as soluções de hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio ou métodos físicos como técnicas de remoção mecânica, vapor de água quente ou ozônio. No entanto, os processos convencionais de higienização não são tão eficazes contra os biofilmes, podendo causar a seleção e resistência desses microrganismos. Portanto, essa resistência aos desinfetantes, associada à percepção negativa do consumidor com relação ao uso de desinfetantes químicos, despertam o interesse para utilização de alternativas naturais. Os compostos derivados de plantas como os óleos essenciais são capazes de penetrar nos biofilmes bacterianos e prejudicar seus mecanismos de desenvolvimento, além de terem fácil degradação no meio ambiente, sendo assim, uma potencial alternativa (GALIÉ et al., 2018; LING et al., 2020; CAMPANA et al., 2017; ROSSI et al., 2020).

Os óleos essenciais podem conter cerca de 20 a 60 componentes, em diferentes concentrações, e são caracterizados por terem 2 ou 3 componentes principais em

concentrações mais altas (20-70%), quando comparados aos outros componentes presentes em traço (BAKKALI et al., 2008).

Estudos têm demonstrado a ação antimicrobiana dos compostos majoritários de óleos essenciais e a capacidade do cinamaldeído, citral, carvacrol ou timol em reduzir o biofilme bacteriano de diferentes espécies (GALIÉ et al., 2018).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a ação bactericida dos compostos majoritários de óleos essenciais cinamaldeído, citral e carvacrol de forma isolada e suas combinações sobre células planctônicas e sésseis de *Bacillus cereus* ATCC 14579.

MATERIAL E MÉTODOS

Componentes majoritários

Os componentes majoritários cinamaldeído (pureza = 93%), carvacrol (pureza = 98%) e citral (pureza = 95%) foram adquiridos pela empresa Sigma-Aldrich.

Microrganismo, manutenção e padronização do inóculo

A cepa bacteriana utilizada foi *Bacillus cereus* ATCC 14579 e a cultura estoque foi mantida em meio de congelamento (15 mL glicerol; 0,3 g extrato de levedura; 0,5 g peptona bacteriológica; 0,5 g NaCl; 100 mL água destilada) a -18 °C.

Para reativação da cepa, inoculou-se uma alíquota de 1 mL da cultura estoque em tubos de ensaio, contendo 10 mL de caldo BHI (Brain-Heart Infusion Broth), seguido de incubação a 37 °C por 24 h.

O inóculo foi padronizado a 10^8 UFC mL⁻¹ por meio de uma curva de crescimento, na qual o desenvolvimento do microrganismo foi monitorado por absorbância (D.O. 600 nm) em espectrofotômetro (BEL SP-2000) e plaqueamento da cultura em meio TSA (Tryptic Soy Agar), pela técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, para posterior contagem de células.

Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

A concentração mínima bactericida (CMB) dos compostos majoritários foi determinada pela técnica de macro diluição em caldo (CLSI, 2019), com adaptações. Para tanto, preparou-se o caldo BHI, acrescido de 0,5% de Tween 80, para diluição dos compostos majoritários que foram utilizados nas seguintes concentrações: 0,016; 0,03; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0%.

Alíquotas de 50 µL da cultura padronizada foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI acrescidos de 0,5% de Tween 80 e das concentrações dos compostos majoritários, os tubos foram então homogeneizados e incubados a 37 °C por 24 h. Após esse período, 100 µL da cultura foram transferidos para placas de Petri contendo TSA e utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície seguida de incubação das placas a 37 °C por 24 h. A menor concentração do composto majoritário em que não houve crescimento visível do microrganismo em placa foi denominada CMB. O experimento foi realizado em triplicata, com três repetições e um controle positivo contendo caldo BHI e inóculo.

Determinação da concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB)

A concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2019) com adaptações, em microplacas de poliestireno de 96 cavidades. Para formação do biofilme, alíquotas de 50 µL de inóculo padronizado foram inoculadas nas cavidades da microplaca de poliestireno contendo 150 µL de caldo BHI e esta foi incubada a 37 °C por 72 h. Após incubação, as culturas foram retiradas das cavidades que foram lavadas três vezes com solução salina 0,85% (m/v), para remoção das células não aderidas. Posteriormente, 200 µL das soluções dos componentes majoritários, nas concentrações de 0,016; 0,03; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0% foram adicionadas às cavidades. As soluções foram preparadas pela homogeneização vigorosa, por 2 min, em agitador tipo vórtex, dos compostos majoritários em água destilada estéril, acrescida de 0,5% (v/v) de Tween 80. Após 20 min de contato, as soluções antimicrobianas foram removidas das cavidades, que foram lavadas três vezes com solução salina. Em seguida, 200 µL de caldo BHI foram adicionados às cavidades e a microplaca foi incubada a 37 °C por 24 h.

As alíquotas das culturas foram plaqueadas pela técnica de microgotas em meio TSA e incubadas a 37 °C por 24 h. A menor concentração do composto majoritário, onde não foi possível observar crescimento em placas, foi denominada de concentração mínima bactericida do biofilme (CMBB). O experimento foi realizado em triplicata e três repetições com um controle positivo, contendo BHI e inóculo.

Ação bactericida das combinações entre os compostos majoritários

Os compostos majoritários citral, carvacrol e cinamaldeído foram testados utilizando suas concentrações mínimas bactericidas (CMB) e mínimas bactericidas do biofilme (CMBB), em combinações dos três compostos, segundo o planejamento experimental de mistura simplex-centróide. A Tabela 1 mostra as diferentes proporções de compostos majoritários utilizadas em cada ensaio.

Tabela 1. Proporções utilizadas nas concentrações dos compostos majoritários.

Ensaio	Cinamaldeído (%)	Citral (%)	Carvacrol (%)
1	100	-	-
2	-	100	-
3	-	-	100
4	50	50	-
5	50	-	50
6	-	50	50
7	67	17	17
8	17	67	17
9	17	17	67
10	33	33	33

Legenda: 100 refere-se à CMB, quando testado em células planctônicas, e à CMBB, quando testado em células sésseis, de cada composto majoritário estudado. Os demais números representam as proporções dos compostos utilizados, baseando-se na CMB ou CMBB.

Para a avaliação do efeito bactericida da combinação entre os compostos majoritários de óleos essenciais foi utilizada a metodologia de macrodiluição em caldo (CLSI, 2019), com adaptações, para células planctônicas e metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2019), com adaptações, em microplacas de poliestireno de 96 cavidades, para células sésseis. Posteriormente, foi realizado o plaqueamento em superfície em meio TSA e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O experimento foi realizado com três repetições, em triplicata, e um controle positivo contendo BHI e inóculo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da CMB e CMBB dos compostos majoritários

Os compostos majoritários cinamaldeído, citral e carvacrol apresentaram o mesmo efeito bactericida sobre as células planctônicas de *B. cereus*, com CMB de 0,0625%. Conforme esperado, foi observada uma maior resistência das células sésseis aos antimicrobianos, sendo as CMBB de 1% para o cinamaldeído e citral e 2% para o carvacrol (TABELA 2).

Tabela 2. Concentrações mínimas bactericidas (CMB) e concentrações mínimas bactericidas do biofilme (CMBB).

Compostos majoritários	CMB (%)	CMBB (%)
Cinamaldeído	0,0625	1
Citral	0,0625	1
Carvacrol	0,0625	2

Na literatura, encontram-se resultados semelhantes aos apresentados nesse trabalho, o que comprova o potencial antimicrobiano desses compostos. Domingues (2015) encontrou uma CMB de 1,2 µL mL⁻¹ (0,12%) para o cinamaldeído e de 0,6 µL mL⁻¹ (0,06%) para o citral, quando estes foram testados sobre células planctônicas de *B. cereus* ATCC 14579 e uma CMBB de 2,5 µL mL⁻¹ (0,25%) para os mesmos compostos quando testados sobre biofilmes desta bactéria.

Pereira (2014), em seu trabalho, encontrou uma CMB de 0,25% para a solução de carvacrol testada sobre células planctônicas de *Salmonella* Enteritidis.

Campana e Baffone (2018) comprovaram em seu estudo a eficácia do carvacrol contra diferentes biofilmes microbianos formados em aço inoxidável e sua capacidade de reduzir o possível recrescimento de células injuriadas dos biofilmes tratados com este composto.

Kwon et al. (2003) estudaram os efeitos bactericidas do cinamaldeído sobre *B. cereus* ATCC 11778 e constataram que houve uma redução de, aproximadamente, 6 ciclos logarítmicos das células viáveis, após tratamento com 0,03% de cinamaldeído e 6 h de incubação. Além disso, também foram observadas alterações em sua morfologia celular como o alongamento das células, falta de separação entre as mesmas e formação incompleta dos septos entre duas células.

O mecanismo de inibição da formação do biofilme ainda não é totalmente compreendido, no entanto, estudos mostram que o cinamaldeído é responsável por inibir a síntese de

DNA, RNA, lipídeos, proteínas, polissacarídeos e causar danos à membrana celular (HYLDGAARD et al., 2012).

Segundo Thielmann e Muranyi (2019), o citral possui ampla atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos e, embora seu mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado, em concentrações biocidas, este composto é capaz de causar danos na estrutura da membrana, comprometendo assim a transferência de elétrons e respiração celular, o que causa esgotamento de energia e morte da célula.

Desse modo, os três compostos majoritários testados foram eficientes na inibição do crescimento de células planctônicas de *B. cereus*, apresentando uma CMB que é considerada baixa.

Geralmente, bactérias Gram-positivas, como *B. cereus*, são mais sensíveis aos óleos essenciais do que bactérias Gram-negativas e isso se deve a diferentes estruturas da parede celular. Pois, a parede celular de bactérias Gram-positivas é composta principalmente por peptidoglicano, que permite a fácil penetração de moléculas hidrofóbicas na célula e sua ação na parede celular e citoplasma. Já as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa composta

por lipopolissacarídeos hidrofílicos (LPS), que as tornam mais resistentes à passagem de compostos hidrofóbicos como os óleos essenciais (NAZZARO et al., 2013).

Esses resultados também comprovam o fato de que bactérias, quando em biofilme se tornam mais resistentes a substâncias antimicrobianas, devido à matriz de exopolissacarídeos que dificulta a penetração dos antimicrobianos na célula e, desse modo, favorece sua sobrevivência e multiplicação (GILBERT et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010; SOMRANI et al., 2020), o que pode ser observado pelos valores de CMBB, que foram mais elevados que os da CMB.

Ação bactericida das combinações entre os compostos majoritários

Ao analisar a ação bactericida das combinações entre os compostos majoritários sobre *B. cereus*, todas as combinações utilizadas inibiram o crescimento da bactéria em seu estado planctônico, como pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3. Ação bactericida das combinações entre os compostos majoritários sobre células planctônicas de *Bacillus cereus*.

Ensaio	Cinamaldeído (% da CMB)	Citral (% da CMB)	Carvacrol (% da CMB)	Resultados
1	0,0625	-	-	-
2	-	0,0625	-	-
3	-	-	0,0625	-
4	0,031	0,031	-	-
5	0,031	-	0,031	-
6	-	0,031	0,031	-
7	0,041	0,011	0,011	-
8	0,011	0,041	0,011	-
9	0,011	0,011	0,041	-
10	0,021	0,021	0,021	-

Legenda: (-) ausência de crescimento visível; (+) presença de crescimento visível.

Nos ensaios 1, 2, 3, onde 100% corresponde ao valor da CMB de cada composto majoritário, não houve crescimento de *B. cereus*, o que comprova o resultado de CMB obtido neste trabalho. Os demais ensaios também não apresentaram crescimento da bactéria, o que mostra que a ação combinada entre diferentes concentrações dos compostos majoritários, inferiores a CMB, foi eficaz para inibir o crescimento de

células planctônicas de *B. cereus*, comprovando que houve uma boa interação entre os compostos.

Ao avaliar as células sésseis, apenas as combinações 1 (1% cinamaldeído), 2 (1% citral), 3 (2% carvacrol), 4 (0,5% cinamaldeído + 0,5% citral) e 5 (0,5% cinamaldeído + 1% carvacrol) foram capazes de inibir o crescimento da bactéria (TABELA 4).

Tabela 4. Ação bactericida das combinações entre os compostos majoritários sobre células sésseis de *B. cereus*.

Ensaio	Cinamaldeído (% da CMBB)	Citral (% da CMBB)	Carvacrol (% da CMBB)	Resultados
1	1,0	-	-	-
2	-	1,0	-	-
3	-	-	2,0	-
4	0,5	0,5	-	-
5	0,5	-	1,0	-
6	-	0,5	1,0	+
7	0,67	0,17	0,34	+
8	0,17	0,67	0,34	+
9	0,17	0,17	1,34	+
10	0,33	0,33	0,66	+

Legenda: (+) presença de crescimento visível; (-) ausência de crescimento visível.

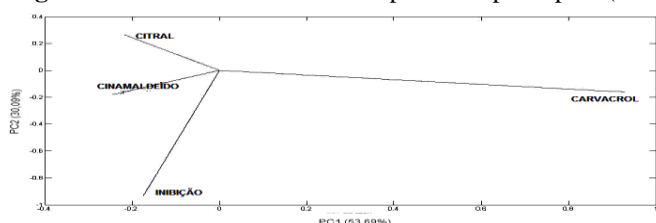
As combinações 1, 2 e 3, nas quais 100% corresponde ao valor da CMBB, comprovam os resultados de CMBB obtidos no trabalho e as combinações 4 e 5 podem ser uma alternativa para formulação de um sanitizante com compostos naturais, já que as concentrações de cada composto foram reduzidas pela metade e, ainda assim, manteve-se o efeito desejado.

Quando o efeito entre as combinações dos compostos é significativamente maior do que a soma entre os efeitos individuais, considera-se que houve sinergismo, se o efeito for igual é um efeito aditivo. Já o antagonismo ocorre quando o valor de um ou ambos compostos é significativamente maior do que o de suas misturas (BASSOLE; JULIANI, 2012; BURT, 2004; SEMENIUC et al., 2017).

Na literatura, é possível encontrar outros trabalhos que demonstram a eficácia de combinações realizadas entre diferentes compostos majoritários. Zhou et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana do cinamaldeído, timol e carvacrol de forma isolada e combinada sobre *Salmonella Typhimurium* e observaram que as combinações entre os compostos tiveram um efeito sinérgico, reduzindo significativamente a população bacteriana. Além disso, as combinações possibilitaram a redução das concentrações de cinamaldeído, timol e carvacrol de 200, 400 e 400 mg L⁻¹ para 100, 100 e 100 mg L⁻¹, respectivamente.

A partir dos resultados das combinações testadas sobre os biofilmes, foi realizada uma Análise dos Componentes Principais (PCA) apresentada na Figura 1, segundo a qual, quanto menor o ângulo formado entre a linha do composto majoritário e a linha de inibição, maior é a contribuição deste composto para a inibição do crescimento bacteriano. Portanto, observa-se que o composto majoritário que mais contribuiu para o efeito bactericida das combinações testadas sobre células sésseis de *B. cereus* foi o cinamaldeído.

Figura 1. Pesos da análise de componentes principais (PCA)



das diferentes combinações dos compostos majoritários sobre a inibição de *B. cereus*.

Di Pasqua et al. (2007), em seus estudos, descobriram que o cinamaldeído não causou a degradação da membrana celular das bactérias testadas e sim uma modificação em sua composição de ácidos graxos, ocasionando a alteração de sua estrutura externa. Essa alteração pode ser responsável por facilitar a incorporação do cinamaldeído ou de outros compostos. Além disso, esse mecanismo que facilita a entrada na célula pode ser uma explicação para o sinergismo quando se utiliza vários antimicrobianos (FRIEDMAN, 2017).

Características do cinamaldeído como sua ação antibacteriana contra diversas bactérias e baixa toxicidade faz com que este composto possa ser utilizado como um possível agente antimicrobiano natural ou um composto a partir do qual novos agentes antimicrobianos possam ser desenvolvidos (DOYLE; STEPHENS, 2019).

Ainda que os compostos majoritários apresentem um boa ação antimicrobiana, seu forte sabor e odor limitam sua

utilização como conservantes de alimentos, pois, se adicionado em concentrações mais elevadas podem causar alterações sensoriais e descaracterizar o produto (ZHOU et al., 2007). Desse modo, a combinação entre eles é uma alternativa para reduzir as concentrações de cada composto utilizada, sem que se perca seu efeito antimicrobiano, melhorar os efeitos conservantes e reduzir o impacto sensorial nos produtos (OUEDRHIRI et al., 2017).

CONCLUSÕES

1. Os compostos majoritários cinamaldeído, citral e carvacrol, quando utilizados de forma isolada ou combinada, apresentaram efeito bactericida sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579, tanto no estado planctônico como no estado sésseis, sendo necessárias maiores concentrações para inibição das células sésseis, conforme esperado.

2. Esses compostos são uma alternativa para serem utilizados como conservantes naturais na indústria alimentícia ou como sanitizantes para o controle do desenvolvimento de biofilmes nas superfícies processadoras de alimentos.

3. É necessário realizar mais testes entre os compostos e diferentes cepas bacterianas para comprovar sua ação antimicrobiana, além de testar sua aplicação em algum produto alimentício, uma vez que a matriz alimentar pode influenciar na ação dos compostos majoritários, bem como proteger as células bacterianas dos danos causados por eles.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências CAPES, CNPq, FAPEMIG e à UFLA. Os autores declaram que não há conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; WAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, Kidlington, v.46, n.2, p.446-475, 2008.
- BASSOLE, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, Basel, v.17, n.4, p.3989-4006, 2012.
- BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. 1st.ed. New York: Springer Science Business, 2008. 276p.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.94, n.3, p.223-253, 2004.
- CAMPANA, R.; BAFFONE, W. Carvacrol efficacy in reducing microbial biofilms on stainless steel and in limiting re-growth of injured cells. *Food Control*, Oxford, v.90, p.10-17, 2018.
- CAMPANA, R.; CASETTARI, L.; FAGIOLI, L.; CESPI, M.; BONACUCINA, G.; BAFFONE, W. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different

- culture media and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.241, p.132-140, 2017.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria. 9th.ed. Wayne: CLSI document M100, 2019.
- DI PASQUA, R.; BETTS, G.; HOSKINS, N.; EDWARDS, M.; ERCOLINI, D.; MAURIELLO, G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, United States, v.55, p.4863-4870, 2007.
- DOMINGUES, A. S. Óleos essenciais e seus compostos puros no controle de células planctônica e sésseis de cepas de *Bacillus cereus*. 2015. 89f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2015.
- DOYLE, A. A.; STEPHENS, J. C. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.139, 2019.
- FRIEDMAN, M. Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.65, p.10406-10423, 2017.
- GALIÉ, S.; GARCIA-GUTIERREZ, C.; MIGUELEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, Switzerland, v.9, p.1-18, 2018.
- GILBERT, P.; McBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Oxford, v.51, n.4, p.245-248, 2003.
- HUANG, Y. Y.; FLINT, S. H.; PALMER, J. S. *Bacillus cereus* spores and toxins - The potential role of biofilms. *Food Microbiology*, Amsterdam, v.90, 2020.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, Switzerland, v.3, n.12, p.1-24, 2012.
- JU, J.; WANG, C.; QIAO, Y.; LI, D.; LI, W. Effects of tea polyphenol combined with nisin on the quality of weever (*Lateolabrax japonicus*) in the initial stage of fresh-frozen or chilled storage state. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Binghamton, v.26, n.5, p.543-552, 2017.
- JU, J.; XIE, Y. F.; GUO, Y. H.; CHENG, Y. L.; QIAN, H.; YAO, W. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v.59, n.20, p.3281-3292, 2019.
- KWON, J. A.; YU, C. B.; PARK, H. D. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, Malden, v.37, n.1, p.61-65, 2003.
- LING, N.; FORSYTHE, S.; WU, Q. P.; DING, Y.; ZHANG, J.; ZENG, H. Insights into *Cronobacter sakazakii* biofilm formation and control strategies in the food industry. *Engineering*, New York, v.6, n.4, p. 393-405, 2020.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, London, v.6, n.12, p.1451-1474, 2013.
- OLIVEIRA, M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. das G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Desinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, Guildford, v.21, n.4, p.549- 553, 2010.
- OUEDRHIRI, W.; MOUNYR, B.; HARKI, E. H.; MOJA, S.; GRECHE, H. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. *International Journal of Food Properties*, Philadelphia, v.20, n.12, p.3149-3158, 2017.
- PEREIRA, A. de. A. Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp. 2014. 93f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2014.
- PINTO, C. L. O.; SOUZA, L. V.; MELONI, V. A. S.; BATISTA, C. S.; SILVA, R.; MARTINS, E. M. F.; CRUZ, A. G.; MARTINS, M. L. Microbiological quality of Brazilian UHT milk: Identification and spoilage potential of spore-forming bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, Malden, v.71, n.1, p.20-26, 2017.
- ROSSI, C.; CHAVES-LOPEZ, C.; SERIO, A.; CASACCIA, M.; MAGGIO, F.; PAPARELLA, A. Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, p.1-20, 2020.
- SEMENIUC, C. A.; POP, C. R.; ROTAR, A. M. Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, Taipei, v.25, n.2, p.403-408, 2017.
- SOMRANI, M.; INGLES, M.-C.; DEBBABI, H.; ABIDI, F.; PALOP, A. Garlic, onion, and cinnamon essential oil anti-biofilms' effect against *Listeria monocytogenes*. *Foods*, Switzerland, v.9, n.5, p.567, 2020.
- THIELMANN, J.; MURANYI, P. Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. *Journal of Essential Oil Research*, United States, v.31, n.5, p.361-378, 2019.
- YUAN, L.; HANSEN, M. F.; RODER, H. L.; WANG, N.; BURMOLLE, M. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Philadelphia, v.60, n.13, p.2277-2293, 2020.
- ZHOU, F.; JI, B.; ZHANG, H.; JIANG, H.; YANG, Z.; LI, J.; LI, J.; YAN, W. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Safety*, Malden, v.27, n.2, p.124-133, 2007.