UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Bioconservação de pescado (surubim – *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria lática bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

Fernanda Barbosa dos Reis

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Bioconservação de pescado (surubim – *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria lática bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em **CIÊNCIAS**

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Fernanda Barbosa dos Reis
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Ribeirão Preto
2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Reis, Fernanda Barbosa dos

Bioconservação de pescado (surubim – *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria lática bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). Ribeirão Preto, 2009.

89p.: Il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: De Martinis, Elaine Cristina Pereira

1. bioconservação 2. *Listeria monocytogenes* 3. *Carnobacterium* 4. *Lippia sidoides*

Fernanda Barbosa dos Reis

Bioconservação de pescado (surubim – *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria lática bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

À minha família, amigos e ao meu namorado pelo apoio. Em especial aos meus pais Armando (in memorian) e Rita pela dedicação, incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Elaine C. P. De Martinis pela orientação, apoio e suporte durante todo o mestrado.

Ao Prof. Dr. Wanderley P. de Oliveira pela doação das preparações de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e pelo auxílio durante o trabalho.

À Luciana P. Fernandes pelo preparo das amostras de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.).

À Profa. Dra. Suely Vilela (Laboratório de Toxinologia – FCFRP-USP), à Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi Navikiene (Departamento de Física e Química – FCFRP-USP) e a Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes (Departamento de Química – FFCLRP-USP) pelo liofilizador.

À Profa. Dra. Tânia Maria Beltramini Trevilato, do laboratório de Pediatria - Setor de Metais da FMRP-USP.

À Profa. Dra. Lone Gram, do Laboratório de Microbiologia do Instituto Dinamarquês para Pesquisas em Pescados (Lyngby, Dinamarca), por ter gentilmente doado as cepas de *C. maltaromaticum* A9b^{+} e A9b^{-} para a execução desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Proc. 2007/05995-0) e pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa (Proc. 2009/08110-4).

Aos colegas do laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP, Bruna, Fabrício, Lizziane, Marina, Otávio, Beatriz e Juliana, pela ajuda, pela troca de experiências e pelo agradável convívio.

À técnica do laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP Vanessa Maciel de Souza, e às auxiliares técnicas Marta Regina de Sousa Thomaz e Patrícia Cintra Junta, pela amizade e pelo auxílio durante todos os experimentos.

RESUMO

REIS, F. B. **Bioconservação de pescado (surubim – *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria lática bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.).** 2009. 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Alimentos minimamente processados refrigerados prontos para o consumo podem veicular a bactéria *Listeria monocytogenes,* causadora de infecções graves principalmente em pessoas imunocomprometidas e mulheres grávidas. A aplicação de tratamentos combinados em alimentos é uma alternativa promissora para inibição efetiva de *L. monocytogenes* e, neste sentido, no presente trabalho foi estudado efeito inibitório de preparações de alecrim pimenta e de bactérias láticas. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de preparações líquidas e secas de alecrim pimenta, em diferentes temperaturas, combinadas ou não com linhagens da bactéria lática *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$). O uso combinado de culturas de *C. maltaromaticum* produtoras (C2, A9b$^+$) e não produtora de bacteriocina (A9b$^-$) com ou sem EAP (extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta) frente a *L. monocytogenes* também foi determinado em sistemas de pescado (caldo de peixe modelo, caldo de surubim e homogeneizado de surubim) mantidos a 5ºC por 35 dias. Os resultados de CIM de EAP frente a *L. monocytogenes* foram de 1,34µl/ml e 0,89µl/ml, respectivamente a 37°C e 5°C, mostrando que houve sinergismo entre EAP e temperatura de refrigeração. Dentre as preparações de alecrim pimenta testadas, EAP apresentou a maior atividade antilisteriana, mas também inibiu as carnobactérias. Não ocorreu sinergismo de EAP combinado com a bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2. Em experimentos de co-inoculação em modelos de pescados, as monoculturas de *L. monocytogenes* e de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^+$ e A9b$^-$) alcançaram populações finais entre 10^6-10^8 UFC/ml. Em caldo de peixe modelo, EAP sozinho e combinado com culturas de *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b$^-$ ou A9b$^+$) apresentou efeito inibitório frente *L. monocytogenes*. Contudo, *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b$^-$ ou A9b$^+$) sem EAP causou pequena inibição de *L. monocytogenes.* Em caldo de surubim, *C. maltaromaticum* C2 foi a bactéria lática mais eficiente para inibir *L. monocytogenes* e houve produção de bacteriocina. Em homogeneizado de surubim com alto nível de inoculação, EAP sozinho e combinado com culturas de *C. maltaromaticum* (A9b$^-$ ou A9b$^+$) apresentou maior efeito inibitório frente *L. monocytogenes*, enquanto que *C. maltaromaticum* C2 com EAP inibiu transitoriamente *L. monocytogenes*, que atingiu população final de aproximadamente 10^6 UFC/ml. *C. maltaromaticum* C2 ou A9b$^-$ inoculados em homogeneizado de surubim com alto nível de inoculação e sem EAP reduziram 3 log de UFC/ml de *L. monocytogenes,* mas na mesma condição foi observada a inibição de apenas 1 log de UFC/ml para *C. maltaromaticum* A9b$^+$. Em homogeneizado de surubim com baixas populações iniciais de *L. monocytogenes* (<10 UFC/ml) foi observado que EAP sozinho e combinado com culturas de *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b$^-$ ou A9b$^+$) apresentou efeito anilisteriano. Entretanto, *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b$^-$ ou A9b$^+$) sem EAP não inibiu *L. monocytogenes*. Foi observado que o uso de EAP e de culturas de carnobactérias tem potencial para inibir *L. monocytogenes* em pescados e que as aplicações devem ser estudadas cuidadosamente, considerando a influência da matriz alimentícia.

Palavras-chave: bioconservação; *Listeria monocytogenes*; *Carnobacterium; Lippia sidoides*

ABSTRACT

REIS, F. B. **Biopreservation of fish ("surubim" – *Pseudoplatystoma* sp.) with the use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) and hidroalcoholic extracts of "alecrim pimenta" (*Lippia sidoides* Cham.). 2009.** 89f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Minimally processed ready-to-eat foods may be contaminated with *Listeria monocytogenes*, which causes severe infection mainly in immunocompromised persons and in pregnant women. The application of combined treatments in foods is a promising alternative for the effective inhibition of *L. monocytogenes* and, in this work, the inhibitory effect of "alecrim pimenta" (*Lippia sidoides* Cham.) and lactic acid bacteria was studied. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of liquid and dried preparations of "alecrim pimenta" was determined in different temperatures, combined or not with strains of *Carnobacterium maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ and A9b$^+$). The combined use of cultures of *C. maltaromaticum* bacteriocin-producing (C2 and A9b$^+$).and non bacteriocin-producing (A9b$^-$) with or without EAP (hydroalcoholic extract of "alecrim pimenta") towards *L. monocytogenes* was also determined in model fish systems (fish model broth, "surubim" fish broth and "surubim" homogenate, at 5°C for 35 days. The results of MICs of EAP against *L. monocytogenes* were 1.34 µl/ml and 0.89 µl/ml, respectively at 37ºC and 5°C, indicating synergistic effect between EAP and low temperature. Among the preparations of "alecrim pimenta" tested, EAP showed the highest antilisterial activity, but it also inhibited carnobacteria. No synergistic effect of EAP combined with bacteriocin of *C. maltaromaticum* C2 was observed. In co-inoculation studies in model fish systems, monocultures of *L. monocytogenes* and *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^+$ and A9b$^-$) reached final populations of 10^6-10^8 CFU/ml. In fish model broth, EAP alone and combined with cultures of *C. maltaromaticum* (C2$^-$ or A9b or A9b$^+$) presented inhibitory effect against *L. monocytogenes*. However, *C. maltaromaticum* (C2 or A9b$^-$ or A9b$^+$) without EAP caused weak inhibition of *L. monocytogenes.* In "surubim" fish broth, *C. maltaromaticum* C2 was the most efficient culture for inhibiting *L. monocytogenes* and bacteriocin was produced. In surubim homogenate with high inoculation level, EAP alone and combined with cultures of *C. maltaromaticum* (A9b$^-$ or A9b$^+$) presented stronger inhibitory effect towards *L. monocytogenes*, while *C. maltaromaticum* C2 with EAP caused only initial inhibition of *L. monocytogenes*, that reached final population of ca. 10^6 CFU/ml. *C. maltaromaticum* C2 or A9b$^-$ inoculated in "surubim" homogenate with high inoculation level without EAP reduced 3 log of CFU/ml of *L. monocytogenes*, but in the same condition it was observed only the reduction of 1 log of CFU/ml for *C. maltaromaticum* A9b$^+$. In "surubim" homogenate with low initial populations of *L. monocytogenes* (<10 CFU/ml) it was observed that EAP alone and combined with co-cultures of *C. maltaromaticum* (C2 or A9b$^-$ or A9b$^+$) presented antilisterial effect. However, *C. maltaromaticum* (C2 or A9b$^-$ or A9b$^+$) without EAP did not inhibit *L. monocytogenes*. It was observed that the use of EAP and cultures of carnobacteria have potential to inhibit *L. monocytogenes* in fish and that the applications should be carefully studied, considering the influence of food matrix.

Keywords: biopreservation; *Listeria monocytogenes*; *Carnobacterium; Lippia sidoides*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições utilizadas para determinação da CIM e CBM de preparações obtidas a partir de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) 22

Tabela 2 - Combinações de *C. maltaromaticum* e extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP) frente a *L. monocytogenes* empregados nos estudos de co-inoculação em sistemas de pescado modelo incubados a 5ºC 35

Tabela 3 - Valores de CIM e de CBM (μg/mL) do extrato hidroalcoólico, do óleo essencial, dos extratos secos por *spray-drying*, e das micropartículas de óleo essencial secas por *spray-drying* de alecrim pimenta frente a diferentes bactérias sob diferentes condições de temperatura e tempo de incubação 40

Tabela 4 - Média das populações (UFC/ml) de *Listeria monocytogenes* inoculada ($<10^1$ UFC/ml) em homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo e armazenado a 5ºC, determinadas por semeadura direta em superfície (0,1ml) em placas de ágar PALCAM e incubadas a 37°C por 48h 52

Tabela 5 - Média de populações de bactérias láticas (UFC/ml) em homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo a 5ºC, determinadas por semeadura por profundidade (1ml) em placas de ágar NAP e incubadas a 25°C por 48h 53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das etapas realizadas por Fernandes (2008) para a obtenção das preparações de *Lippia sidoides* utilizadas neste trabalho 20

Figura 2. Representação esquemática das etapas realizadas na técnica de extração ácida otimizada (TULINI, 2008), para obtenção da bacteriocina semi-purificada de *Carnobacterium piscicola* C2. Os números em parênteses referem-se à segunda etapa da extração, onde o *pellet* 3 foi novamente ressuspendido no sobrenadante da cultura..... 26

Figura 3. Representação esquemática da placa de microtitulação utilizada para a determinação da concentração bactericida fracionada (CBF) do extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP) e da bacteriocina semipurificada produzida por *C. maltaromaticum* C2 frente a *L. monocytogenes*..... 29

Figura 4. Médias das populações de *L. monocytogenes* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de peixe modelo mantidos a 5ºC..... 44

Figura 5. Médias das populações de *C. maltaromaticum* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de peixe modelo mantidos 5ºC 44

Figura 6. Médias das populações de *L. monocytogenes* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de surubim mantidos a 5ºC 47

Figura 7. Médias das populações de *C. maltaromaticum* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de surubim mantidos a 5ºC 47

Figura 8. Produção de bacteriocina em caldo de surubim a 5ºC com monocultura de *C. maltaromaticum* C2 e com co-cultura de *C. maltaromaticum* C2 e *L. monocytogenes* 48

Figura 9. Populações de *L. monocytogenes* (log UFC/ml) em experimentos realizados em homogeneizado de surubim mantidos a 5ºC..... 50

Figura 10. Médias das populações de bactérias láticas (log UFC/ml) em experimentos realizados em homogeneizado de surubim mantidos a 5ºC 51

SUMÁRIO

RESUMO i

ABSTRACT ii

LISTA DE TABELAS iii

LISTA DE FIGURAS iv

1. INTRODUÇÃO 2

1.1 *Listeria monocytogenes* 4

1.2 Bactérias láticas e bacteriocinas 5

1.2.1 *Carnobacterium* spp 7

1.3 Extratos de plantas e seus derivados 9

1.3.1 *Lippia sidoides* Cham 10

2. RELEVÂNCIA DO TRABALHO 13

3. OBJETIVOS 16

3.1 Objetivos específicos 16

4. MATERIAIS E MÉTODOS 19

4.1 Cepas bacterianas 19

4.2 Extrato hidroalcoólico e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) 20

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das preparações obtidas a partir de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) 21

4.4 Extração ácida da bacteriocina produzida por *Carnobacterium maltaromaticum* C2 24

4.5 Quantificação de bacteriocina (modificado de Mayr-Harting, Hedges, Berkeley, 1972) 27

4.6 Estudo *in vitro* de sinergismo entre bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 e extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP) 28

4.7 Desenvolvimento de sistemas modelo para estudos de bioconservação 30

4.7.1 Preparação do Caldo de peixe modelo 30

4.7.2 Enumeração da microbiota autóctone de filé de surubim defumado e embalado a vácuo 31

4.7.3 Preparação do Caldo de surubim 32

4.7.4 Preparação do homogeneizado de surubim 33
4.7.5 Experimentos de co-inoculação 34
4.7.6 Verificação de produção de bacteriocina nos modelos de pescados 36
4.7.7 Análise estatística 37

5. RESULTADOS 39
5.1 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) 39
5.2 Quantificação da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 41
5.3 Estudo de sinergismo 42
5.4 Experimentos de co-inoculação 43
5.4.1 Caldo de Peixe Modelo 43
5.4.2 Enumeração da microbiota autóctone de filé de surubim defumado embalado a vácuo 45
5.4.3 Caldo de Surubim 46
5.4.4 Homogeneizado de surubim 48

6. DISCUSSÃO 55

7. CONCLUSÕES 66

8. REFERÊNCIAS 69

ANEXO 82

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Pescados representam importantes fontes de proteínas na alimentação do ser humano, apresentam alta qualidade nutricional e alta digestibilidade, com quantidade de proteína semelhante às encontradas nas carnes bovina e de frango. Além disso, os valores encontrados para vitamina A, cálcio e fósforo são superiores na carne de peixe, quando comparados com a carne bovina e de frango (OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008).

Segundo dados da "Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação" - FAO (2006), a média do consumo *per capita* de pescado no Brasil foi de 6,8 kg em 2003, sendo inferior aos 12 kg/pessoa/ano recomendado pela "Organização Mundial de Saúde" (OMS).

Entretanto, a produção de pescado no Brasil elevou-se para 1.050.808 toneladas em 2006, representando um crescimento de 4,1% na produção total em relação a 2005. A produção de peixe surubim no Brasil, em 2006, foi de aproximadamente 7,5 toneladas, sendo os estados da Bahia e do Pará os maiores produtores (IBAMA, 2008).

Em 2004, o comércio mundial de pescado preparado e conservado totalizou 8,3 milhões de toneladas, representando 15% do total das exportações comparado com 10% em 1994; sendo que a exportação de pescado curado foi de cerca de 5% em 2004 (FAO, 2007).

Atualmente, com o aumento da demanda por alimentos saudáveis por parte dos consumidores, a indústria alimentícia tem buscado substituir as técnicas tradicionais de conservação de alimentos (intensos tratamentos térmicos, acidificação, secagem e conservadores sintéticos) por novas técnicas (alta pressão

hidrostática, campo de pulso elétrico, embalagem com atmosfera modificada e utilização de compostos antimicrobianos naturais). Com isso, objetiva-se a obtenção de alimentos de fácil preparo, com aparência de frescos, sem conservadores sintéticos, minimamente processados e refrigerados, com uma vida de prateleira prolongada (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004). A indústria de alimentos também tem buscado melhorar a relação custo-benefício, pela agregação de produtos preparados com matérias-primas de menor valor comercial, tais como a adição de salmouras para fabricação de produtos curados cozidos, marinados ou condimentados, os quais representam um mercado crescente (PASTORE, 2006).

Entretanto, alimentos minimamente processados podem apresentar um grande risco microbiológico, pois os procedimentos para limitar a multiplicação de patógenos neste tipo de alimento são a conservação em baixa temperatura e/ou a embalagem em atmosferas modificadas. Essas condições são restritivas somente para alguns microrganismos, podendo favorecer a prevalência de bactérias anaeróbias e psicrotróficas (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Vários autores relataram que pescados minimamente processados representam um excelente sistema para a multiplicação de microrganismos patogênicos psicrotróficos, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, e dessa forma, podem representar um risco para a saúde dos consumidores (ATANASSOVA; REICH; KLEIN, 2008; BASTI et al., 2006; DESTRO, 2000; FARBER, 2000; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002; GRAM, 2001; KARUNASAGAR; KARUNASAGAR, 2000; PAO et al., 2008).

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é o patógeno causador da listeriose, uma doença grave que acomete principalmente gestantes, recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos (ROCOURT; JACQUET; REILLY, 2000). As principais síndromes clínicas causadas por *L. monocytogenes* incluem gastrenterite febril, infecções perinatais e infecções no sistema nervoso central, com ou sem bacteremia (DREVETS; BRONZE, 2008).

A dose infectiva desse patógeno alimentar é estimada entre 10-100 milhões de unidades formadoras de colônias (UFC) em hospedeiros saudáveis, e somente 0,1-10 milhões de UFC em pessoas com condições predisponentes (BORTOLUSSI, 2008).

L. monocytogenes é bacilo gram-positivo que pode crescer tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias (SCHELCH et al., 2005). Essa bactéria é capaz de sobreviver e crescer em diversas condições de ambiente como temperaturas de refrigeração, baixo pH e altas concentrações de sal (GANDHI & CHIKINDAS, 2007).

L. monocytogenes é amplamente dispersa na natureza e já foi isolada de diferentes alimentos como leite cru e pasteurizado, queijos, lingüiça frescal, salame, carne de peru, peixes, embutidos cárneos, alimentos prontos para consumo, além de produtos de origem vegetal (ARAÚJO et al., 2002; ATANASSOVA; REICH; KLEIN, 2008; BORGES et al., 1999; CABEDO et al., 2008; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2002; PAO et al., 2008; SAKATE et al. 2003; SILVA et al., 2004).

Resultados de estudos realizados na cidade de Ribeirão Preto demonstraram a presença de *Listeria* spp. e de *L. monocytogenes* em surubim defumado a frio e embalado a vácuo, queijo fresco, carne bovina moída crua, presunto cozido e mussarela fatiados congelados (ALVES, 2005; MACIEL, 2003; RATTI, 2006).

A contaminação de produtos prontos para o consumo com *L. monocytogenes* pode ocorrer em vários estágios, por meio de manipuladores de alimentos, no local de processamento, durante a adição de ingredientes crus, ou após tratamento de letalidade na área de embalagem de alimentos (LIANOU; SOFOS, 2007).

Dentre as diversas formas de controlar a multiplicação de *L. monocytogenes* em alimentos, destaca-se o uso de bactérias láticas. Atualmente, inúmeras pesquisas têm avaliado o efeito inibitório das bactérias láticas e de suas bacteriocinas sobre *Listeria* spp. (ALLENDE et al., 2007; ALVES et al., 2006; BENKERROUM et al., 2005; BROMBERG et al., 2006; CARVALHO et al., 2006; DE MARTINIS et al., 2001; HÉQUET et al., 2007; MARTINEZ; DE MARTINIS, 2005; NILSSON; GRAM; HUSS, 1999; PRADO et al., 2000; TOMÉ; TEIXEIRA; GIBBS, 2006, TOMÉ; GIBBS; TEIXIERA, 2008).

1.2 Bactérias láticas e bacteriocinas

As bactérias láticas (BAL) são bactérias Gram-positivas, catalase negativas e que produzem ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos (KONINGS et al., 2000).

Os produtos finais do metabolismo dessas bactérias, como ácido lático e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil e acetoína, podem atuar

como bioconservadores, alterando as propriedades intrínsecas de alimentos e inibindo microrganismos deteriorantes (DEEGAN et al., 2006).

Muitas BAL são ainda capazes de produzir bacteriocinas, que são moléculas protéicas com alto poder antimicrobiano mesmo em baixas concentrações. Essas moléculas apresentam características de estabilidade ao calor, baixo pH, refrigeração, congelamento, resistência a ácidos orgânicos fracos, sais e diversas enzimas, mas são sensíveis a enzimas proteolíticas (SOUZA; SILVA; SOUSA, 2005).

Cotter, Hill e Ross (2005) propuseram a classificação das bacteriocinas em duas categorias, sendo que a classe I compreende bacteriocinas que contêm lantionina, formadas por um ou dois peptídeos (por ex. nisina e lacticina 3147, respectivamente) e a classe II formada pelas bacteriocinas que não contêm lantionina. A classe II inclui pequenos peptídeos de estrutura heterogênea e pode ser subdividida nas classes IIa (bacteriocinas semelhantes à pediocina), IIb (bacteriocinas formadas por dois peptídeos), IIc (bacteriocinas cíclicas) e IId (peptídeos lineares formados por uma unidade, não semelhantes à pediocina). Os mesmos autores propuseram também que proteínas líticas de alto peso molecular fossem denominadas bacteriolisinas.

As bacteriocinas têm potencial para aplicação na indústria alimentícia, contribuindo para diminuição do uso de conservadores artificiais e tratamentos térmicos, propiciando a obtenção de alimentos com aparência mais fresca e com propriedades nutricionais e sensoriais bem preservadas (GALVÉZ et al., 2007).

Segundo Galvéz et al. (2007), as bacteriocinas produzidas pelas BAL são apropriadas para conservação de alimentos, pois (i) muitas linhagens são geralmente reconhecidas como seguras; (ii) não são ativas nem tóxicas para células

eucarióticas; (iii) tornam-se inativas pela digestão por proteases, tendo pouca influência sobre a microbiota intestinal; (iv) geralmente toleram altas temperaturas e ampla faixa de pH; (v) apresentam modo de ação bactericida, com ação principalmente sobre a membrana citoplasmática das bactérias e, (vi) possuem determinantes genéticos geralmente localizados em plasmídeos.

Os principais gêneros pertencentes ao grupo das BAL são: *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Carnobacterium* e *Vagococcus* (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Em alguns estudos foi proposta a utilização do gênero *Carnobacterium* no controle de *L. monocytogenes* em pescados (ALVES, 2005; BRILLET et al., 2005; DUFFES et al., 1999; JOFFRAUD et al., 2006; NILSSON; GRAM; HUSS, 1999; SCHÖBITZ et al., 2006; YAMAZAKI et al., 2003).

1.2.1 *Carnobacterium* spp.

O gênero *Carnobacterium* é formado por bacilos Gram-positivos, que são capazes de sobreviver a baixas temperaturas, anaerobiamente, e com concentração elevada de CO_2 e são tolerantes a congelamentos/descongelamentos (LEISNER et al., 2007).

Consiste de nove espécies: *C. alterfunditum, C. mobile, C. pleistocenium, C. viridans, C. funditum, C. gallinarum, C. inhibens, C. maltaromaticum (*antes denominado *C. piscicola)* e *C. divergens*, sendo isolados de peixe, carne de porco marinada, carne refrigerada e laticínios (ERCOLINI et al., 2009; LEISNER et al., 2007; SCHIRMER, HEIR, LANGSRUD, 2009).

Nas duas últimas décadas, devido à sua presença no ambiente aquoso, *Carnobacterium* sp. têm sido estudado como patógeno de peixes e também em procedimentos de bioconservação de pescados para inibir microrganismos deteriorantes e patogênicos (LEISNER et al., 2007).

Algumas bacteriocinas produzidas por bactérias do gênero *Carnobacterium* foram caracterizadas e pertencem às classes I e II. Apenas a bacteriocina UI149 contém lantionina e pertence à classe I, enquanto que todas as outras bacteriocinas descritas para *Carnobacterium* sp. são da classe II, sendo a maioria pertencente à classe IIa. Bacteriocinas da classe II podem exercer atividade antilisteriana pela formação de poros e alteração do potencial de membrana celular, causando extravasamento de substâncias de baixo peso molecular (LEISNER et al., 2007).

Em nosso país, *C. piscicola* C2 produtor de bacteriocina foi isolado a partir de pescado, por Alves (2005). De acordo classificação de Mora et al. (2003), atualmente *C. piscicola* C2 foi renomeado como *C. maltaromaticum* C2. Tulini, Reis e De Martinis (2009) e Tulini e De Martinis (no prelo) estudaram a bacteriocina produzida por *C. maltaromaticum* C2 e demonstraram que ela apresentava massa molecular entre 3500-6500 Da. e era termoestável (30 minutos a 100°C). Outra linhagem de *Carnobacterium* produtora de bacteriocina (*C. piscicola* A9b^{+}) foi isolada de pescado na Dinamarca por Nilsson, Gram e Huss (1999). Nilsson et al. (2002), demonstraram que o peptídeo antimicrobiano produzido por aquela linhagem pertencia à classe IIa e apresentava massa molecular de 4969,5 Da.

O uso de BAL ou de suas bacteriocinas combinado com extratos naturais ou óleos essenciais de plantas e seus derivados podem produzir um efeito sinérgico, atuando com mais efetividade na inibição de patógenos em alimentos, pois quando é utilizado mais de um fator antimicrobiano, a intensidade de danos à bactéria pode

ser bem maior, desde que esses fatores atuem por mecanismos diferentes e sobre a mesma célula alvo (ALTIERI et al., 2005; BREWER; ADAMS; PARK, 2002; ETTAYEBI; YAMANI; ROSSI-HASSANI, 2000; GALVÉZ et al., 2007; GHALFI et al., 2007; GRANDE et al., 2007; KRUGER, 2006; MISAGHI; BASTI, 2007; PERIAGO; MOEZELAAR, 2001; POL; SMID, 1999; RAJKOVIC et al., 2005; SIVAROOBAN; HETTIARACHCHY; JOHNSON, 2007).

1.3 Extratos de plantas e seus derivados

Os extratos de plantas geralmente contêm mais de um composto com atividade antimicrobiana, e são muito utilizados na indústria alimentícia, sendo que muitos são considerados “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS) (KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATSIS, 2007).

De acordo com Burt (2004), óleos essenciais de plantas e seus derivados são amplamente aplicados como ingredientes aromatizantes em uma variedade de alimentos e bebidas, sendo também de grande utilidade no controle de patógenos veiculados por alimentos.

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para avaliar a atividade antimicrobiana de compostos naturais de plantas frente a patógenos alimentares (AHN; GRU; MUSTAPHA, 2007; BURT, 2004; CARRAMINÃNA et al., 2008; CONTE et al., 2007; CORBO et al., 2008; DORMAN; DEANS, 2000; FIROUZI et al., 2007; HARPAZ et al., 2003; KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULAMATSIS, 2007; MICHELIN et al., 2005; OUSSALH et al., 2007; OWEN; PALOMBO, 2007; SANDRI et al. 2007; VELDHUIZEN et al., 2007; ZHOU et al., 2007).

1.3.1 *Lippia sidoides* Cham.

Lippia sidoides Cham., popularmente conhecida como alecrim pimenta, é uma planta arbustiva encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte, pertencente à família Verbenaceae (COSTA et al., 2002).

Vários trabalhos têm demonstrado muitas propriedades biológicas do óleo essencial de *L. sidoides* tais como: atividade larvicida contra *Aedes aegypti* Linn. (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004), efeito antioxidante, potencial agente gastroprotetor e anti-inflamatório tópico contra diversos patógenos humanos (MONTEIRO et al., 2007), atividade antifúngica (FONTENELLE et al., 2007), atividade anti-helmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

O extrato hidroalcoólico de *L. sidoides* demonstrou atividade antimicrobiana frente a diferentes cepas de *Streptococcus mutans* (NUNES et al., 2005).

O uso combinado de gel herbal de *Myracrodruon urundeuva* 5% (p/p) e de óleo essencial de *Lippia sidoides* 0,5% (v/p) em doença periodontal experimental, demonstrou atividade anti-inflamatória e antibacteriana (BOTELHO et al., 2007b).

Oliveira et al. (2006) observaram a ação potencializadora do óleo essencial de *L. sidoides* na presença dos antibióticos ampicilina, cefalotina e cloranfenicol na inibição *in vitro* de *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa.*

Estudos realizados com ratos e camundongos para análise de toxicidade aguda, demonstraram que o óleo essencial de *L. sidoides* não apresentou toxicidade nas doses estudadas (FONTENELLE et al., 2007; MONTEIRO et al., 2007).

Segundo um trabalho realizado por Botelho et al. (2007a), foi determinada a composição química do óleo essencial de *L. sidoides*, apresentando como constituintes majoritários o timol (56,7%) e o carvacrol (16,7%). Naquele mesmo trabalho, foi verificada a atividade antimicrobiana do óleo essencial e de seus constituintes majoritários, demonstrando que apresentavam atividade contra espécies do gênero *Streptococcus* e *Candida albicans*.

Fernandes et al. (2008), determinaram por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) que timol é o componente majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* (72%). Também foi demonstrado o efeito antifúngico do óleo essencial de *L. sidoides* microencapsulado por *spray-drying*, sendo que as diferentes formulações das micropartículas apresentaram atividade contra diferentes cepas de *Candida* spp., com diâmetros de zonas de inibição de 9 a 16 mm, em testes de antagonismo em ágar.

Os mecanismos de ação antimicrobiana do timol e do carvacrol foram estudados por Shapiro e Guggenheim (1995) frente a bactérias orais. Aqueles autores concluíram que timol exerce efeito sobre o potencial transmembrana dos microrganismos, mas que provavelmente o principal modo de ação é a ruptura da integridade da membrana, ocasionando extravasamento de substâncias intracelulares. Xu et al. (2008) utilizaram a técnica de citometria de fluxo para estudar os efeitos antimicrobianos de timol e carvacrol sobre células de *Escherichia coli* e também atribuíram o efeito antimicrobiano à permeabilização e despolarização da membrana citoplasmática.

RELEVÂNCIA DO TRABALHO

2. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Há crescente demanda por pescados minimamente processados e prontos para o consumo, mas esses alimentos são altamente susceptíveis à deterioração e podem suportar o crescimento de bactérias patogênicas. A contaminação pode ocorrer em etapas pós-processamento, sendo *L. monocytogenes* uma das principais preocupações. Desse modo, é crucial um maior conhecimento a respeito da presença e multiplicação dessa bactéria nos alimentos e de agentes antimicrobianos naturais com atividade antilisteriana, para diminuir riscos à saúde dos consumidores.

Em um trabalho publicado recentemente por Uyttendaele et al. (2009), foi demonstrado que peixe defumado pode ser considerado um produto de alto risco de contaminação por *L. monocytogenes,* com ocorrência deste patógeno em 28,8% das amostras analisadas e com populações acima de 100 UFC/ml.

A aplicação de bacteriocinas ou de culturas de bactérias láticas produtoras de bacteriocinas em alimentos tem uso potencial como parte da conservação de alimentos pela tecnologia dos obstáculos. As bacteriocinas têm mostrado sinergismo com outros tratamentos e podem ser usadas como barreiras para melhorar a segurança de alimentos, sendo muito atrativas para alimentos minimamente processados e refrigerados (SCHÖBITZ et al., 2006).

De acordo com o trabalho de Alves (2005), *C. maltaromaticum* C2 tem potencial para ser usada como cultura bioconservadora em peixe. A autora verificou que a multiplicação de *L. monocytogenes* foi inibida em caldos de salmão e de surubim defumados a frio por cepas bacteriocinogênicas de *C. maltaromaticum*. Já no homogeneizado de surubim defumado embalado a vácuo, as cepas de *C.*

maltaromaticum apresentaram multiplicação lenta, mas foram capazes de reduzir as populações máximas de *L. monocytogenes* (ALVES, 2005).

Diversas bacteriocinas têm demonstrado efeitos aditivos ou sinérgicos quando usadas em combinação com outros agentes antimicrobianos, incluindo conservadores químicos, compostos fenólicos naturais e também outras proteínas antimicrobianas (GALVÉZ et al., 2007).

Existem poucas informações sobre a presença e significância de *Listeria* spp. em produtos de peixe da América Latina (DESTRO, 2000). Devido a essa escassez de dados da literatura sobre a presença de *Listeria* spp. em pescados, bem como sobre a avaliação do uso de bactérias láticas, bacteriocinas e/ou de extratos naturais de plantas como bioconservadores nestes produtos, há necessidade de mais estudos para aplicação de novos sistemas de bioconservação.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Investigar a atividade inibitória de culturas de bactérias láticas da espécie *Carnobacterium maltaromaticum* (produtoras e não produtoras de bacteriocina) e de preparações de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) frente a *Listeria monocytogenes* sob refrigeração (5°C) em meio de cultura, em caldo de peixe modelo e em caldo e homogeneizado de filé de surubim defumado embalado a vácuo.

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a ação inibitória *in vitro* do extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta frente a *Listeria monocytogenes* IAL 633, *Carnobacterium maltaromaticum* C2, *Carnobacterium maltaromaticum* A9b$^+$ e *Carnobacterium maltaromaticum* A9b$^-$, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

- ✓ Avaliar a atividade antilisteriana do óleo essencial e de formulações de extrato hidroalcoólico e de óleo essencial de alecrim pimenta secos por *spray-drying* frente a *Listeria monocytogenes* IAL 633, determinando a CIM e a CBM.

- ✓ Determinar a concentração bactericida fracionada (CBF) da bacteriocina produzida por *Carnobacterium maltaromaticum* C2 contra *Listeria monocytogenes* IAL 633, determinando a CBM.

- ✓ Avaliar a ação antilisterial do extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta e culturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) em caldo de peptona de peixe e em caldo e homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo, armazenado sob refrigeração durante 35 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas

Neste trabalho foi utilizada *L. monocytogenes* IAL 633, sorotipo 1/2a, que foi mantida congelada a -70°C, em caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI, Oxoid) adicionado de 20% de glicerol (p/v) (Synth). Essa cepa foi reativada em caldo BHI e incubada a 37°C por 24 horas.

As bactérias láticas utilizadas neste estudo foram *Carnobacterium maltaromaticum* C2 bacteriocinogênica, *Carnobacterium maltaromaticum* A9b$^+$ bacteriocinogênica e *Carnobacterium maltaromaticum* A9b$^-$ não-bacteriocinogênica.

C. maltaromaticum A9b$^+$ bacteriocinogênico e *C. maltaromaticum* A9b$^-$ não-bacteriocinogênico (anteriormente denominados *Carnobacterium piscicola*) foram gentilmente cedidos pela Dra. Lone Gram, do laboratório de Microbiologia do Instituto Dinamarquês para Pesquisas em Pescados, Lyngby, Dinamarca (HIMELBLOOM; NILSSON; GRAM, 2001; NILSSON et al., 2005). Estas cepas estão mantidas congeladas a -70°C, em caldo de Infusão de Cérebro Coração (BHI – Oxoid) adicionado de 20% de glicerol (p/v) (Synth). No momento do uso, as cepas foram reativadas em caldo BHI (Oxoid), sendo incubadas a 25°C por 24 horas.

C. maltaromaticum C2, foi previamente isolado no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP, a partir de surubim defumado a frio e embalado a vácuo (ALVES, 2005). Este isolado está mantido congelado a -70°C, em caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI-Oxoid) adicionado de 20% de glicerol (p/v) (Synth). No momento do uso, a cultura foi reativada em caldo de Infusão Cérebro Coração (BHI-Oxoid), sendo incubada a 20°C por 24 horas.

4.2 Extrato hidroalcoólico e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

As preparações de alecrim pimenta (*L. sidoides*) foram obtidas por Fernandes (2008) sob orientação do Prof. Dr. Wanderley P. de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) e doadas para realização deste trabalho. O esquema do processo de obtenção das referidas preparações está mostrado na figura 1 e são detalhados em anexo 1.

Nesse trabalho foram utilizados o extrato hidroalcoólico (EAP), o óleo essencial (OEAP), preparações secas por *spray-drying* do extrato hidroalcoólico (E1 e E2) e de óleo essencial (O1 e O2) de alecrim pimenta (FERNANDES, 2008; FERNANDES et al., 2008).

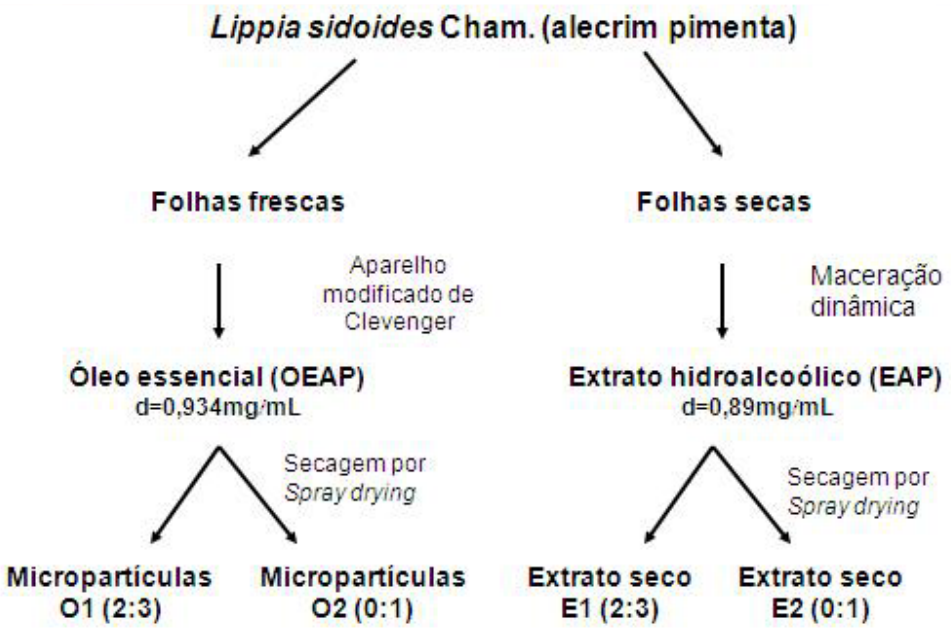

Figura 1. Representação esquemática das etapas realizadas por Fernandes (2008) para a obtenção das preparações de *Lippia sidoides* utilizadas neste trabalho.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das preparações obtidas a partir de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

Para avaliação da atividade da concentração inibitória mínima (CIM) das preparações de alecrim pimenta (EAP, OEAP, E1, E2, O1 e O2) frente a *L. monocytogenes* e/ou *C. maltaromaticum*, foi empregado o método de macrodiluição em caldo segundo o "Clinical and Laboratory Standards Institute" (2003), com modificações. Foi determinada também a concentração bactericida mínima (CBM), de acordo com a metodologia descrita por Botelho et al. (2007a).

Na tabela 1 estão mostradas as condições experimentais utilizadas para determinar CIM e CBM das preparações obtidas a partir de alecrim pimenta.

Tabela 1. Condições utilizadas para determinação da CIM e CBM de preparações obtidas a partir de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)*.

Preparação	Concentração	Inóculo	Temperatura e Tempo de incubação	Meio de Cultura
EAP	0,5µl/ml, 1µl/ml, 2µl/ml, 4µl/ml, 8µl/ml, 16µl/ml, 30µl/ml	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h 5ºC por 12 dias	
		C. maltaromaticum C2	25ºC por 24h 5ºC por 7 dias	
		C. maltaromaticum A9b^{+}	25ºC por 24h 5ºC por 7 dias	
		C. maltaromaticum A9b^{-}	25ºC por 24h 5ºC por 7 dias	Caldo BHI + DMSO 2%
E1	3000µg/ml; 6250µg/ml; 1250µg/ml; 25000µg/ml; 50000µg/ml; e 100000µg/ml	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	
E2		*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	
OEAP	0,5µl/ml, 1µl/ml, 2µl/ml, 4µl/ml, 8µl/ml, 16µl/ml, 30µl/ml	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	Caldo BHI adicionado de Tween 80 0,5%
O1	3000µg/ml; 6250µg/ml; 12500µg/ml; 25000µg/ml; 50000µg/ml; e 100000µg/ml	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	
O2		*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	

* CIM = concentração inibitória mínima; CBM = concentração bactericida mínima; DMSO = dimetilsulfóxido; EAP = extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta; OEAP = óleo essencial de alecrim pimenta; E1 e E2 = extratos de alecrim pimenta secos por *spray-drying*; O1 E O2 = micropartículas de óleo essencial de alecrim pimenta secas por *spray-drying*.

Para obtenção dos inóculos bacterianos ajustados para os testes de macrodiluição em caldo, as bactérias foram incubadas durante 24h em caldo BHI, a 37ºC para *L. monocytogenes* e a 25ºC para os isolados de *C. maltaromaticum*.

A partir das culturas reativadas, foram preparadas outras culturas de *L. monocytogenes* e de *C. maltaromaticum*, que foram incubadas por até 4h para alcançar a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5 ou densidade ótica de

0,1 a 620 nm com o auxílio de um espectrofotômetro (UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer SHIMADZU). A partir destas suspensões, foram realizadas três diluições decimais seriadas em caldo BHI (Oxoid) para obter as populações bacterianas entre 10^5-10^6 UFC/mL (inóculo ajustado).

Para o teste de macrodiluição em caldo, 1 mL do inóculo ajustado foi transferido para cada tubo contendo 1 mL de caldo BHI acrescido de diferentes concentrações das preparações de alecrim pimenta (EAP, OEAP, E1, E2, O1 e O2) (tabela 1).

Para as preparações contendo óleo essencial (OEAP, O1 e O2) foi utilizada uma solução de Tween 80 0,5% (Sigma), e para as preparações contendo extrato hidroalcoólico foi adicionado dimetilsulfóxido 2% (DMSO - Sigma). Para melhorar a solubilidade do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de alecrim pimenta no meio de cultura foram utilizados Tween 80 e DMSO (NASCIMENTO et al., 2007; VALGAS, et al., 2007).

Os tubos foram incubados a 37ºC por 24h para *L. monocytogenes*, a 25ºC por 24h para os isolados de *C. maltaromaticum*, e a 5ºC por 7 dias para os isolados de *C. maltaromaticum* ou a 5ºC por 12 dias para *L. monocytogenes*, conforme tabela 1.

Como controles foram utilizados tubos contendo o meio de cultura e o inóculo bacteriano ajustado (controle positivo) e tubos contendo somente o meio de cultura sem o inóculo bacteriano (controle negativo).

Decorrido o tempo de incubação, foi feita a leitura dos tubos a olho nu, e foi determinada a CIM das preparações de alecrim pimenta. A CIM foi considerada como a menor concentração que inibiu visivelmente a bactéria analisada.

A enumeração das células viáveis foi feita por semeadura em superfície em placas de Petri contendo ágar BHI, as quais foram incubadas a 37ºC por 24h (para

L. monocytogenes) ou a 25ºC por 48h (para as culturas de *C. maltaromaticum*). Decorrido o tempo de incubação, foi determinada a CBM das preparações de alecrim pimenta, como sendo a menor concentração do antimicrobiano que apresentou efeito bactericida frente à bactéria investigada.

Os resultados da CIM e da CBM do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial foram expressos como a média dos valores obtidos em dois experimentos independentes, realizados em triplicatas ± desvio padrão.

Os valores de CIM e de CBM dos extratos secos (E1 e E2) e das micropartículas de óleo essencial (O1 e O2) foram expressos como a média dos valores obtidos em um único experimento, realizado em triplicata ± desvio padrão.

4.4 Extração ácida da bacteriocina produzida por *Carnobacterium maltaromaticum* C2

A extração da bacteriocina foi realizada pela adsorção do peptídeo à parede das células produtoras em pH 6,0 e dessorção em pH 1,5 (“extração ácida”) de acordo com a metodologia descrita por Tulini e De Martinis (no prelo) e esquematizado na figura 2. Nesta técnica, a extração ácida é realizada duas vezes a partir do mesmo caldo de cultura de *C. maltaromaticum* C2, a fim de otimizar o processo de extração.

C. maltaromaticum C2 foi inoculado 1% (v/v) em 2000 ml de caldo BHI, a partir de uma cultura de 24h em caldo BHI. Foi realizada incubação a 20°C por 18h e, posteriormente a cultura foi aquecida a 70°C por 30 minutos em banho-maria (Banho Dubnoff CT-232) para inativação enzimática. Foi retirado 1 ml do caldo

aquecido para quantificação de bacteriocina (item 4.5) e em seguida, o pH foi ajustado para 6,0 para adsorção da bacteriocina nas células produtoras.

O caldo tratado termicamente e com pH 6,0 foi deixado em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente e, foi centrifugado sob refrigeração (4ºC) a 6048xg por 20 minutos (Sorvall RC 5C Plus). O sobrenadante deste caldo foi guardado em um béquer para posterior utilização em uma segunda extração. O precipitado celular (*pellet 1*) obtido foi ressuspendido em 50 ml de tampão fosfato 5mM de pH 6,0 e centrifugado a 4ºC a 10080xg por 10 minutos (Sorvall Legend Mach 1.6R). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado novamente e o precipitado celular (*pellet 2*) obtido foi ressuspendido em 50 ml de NaCl 0,1M com pH 1,5, para favorecer a dessorção da bacteriocina. A suspensão foi mantida sob agitação a 4ºC por 1h e em seguida, a suspensão foi centrifugada a 4ºC a 10080xg por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi denominado “sobrenadante final 1” e foi guardado em geladeira (4°C), e o *pellet 3* obtido foi utilizado na próxima extração.

O *pellet* 3 foi ressuspendido em 2000 ml do sobrenadante inicial e o processo de extração ácida foi repetido.

Os sobrenadantes das duas extrações (sobrenadante final 1 e sobrenadante final 2) foram reunidos, totalizando aproximadamente 200 ml. Foi retirado 1 ml para quantificação de bacteriocina e o restante do extrato foi dialisado por.96h com cinco trocas de água em membrana com limite de exclusão de 1KDa (Spectra/Por® Biotech Cellulose Ester Dialysis Membrane, Spectrum). O sobrenadante dialisado foi congelado a -20ºC e liofilizado (liofilizador Equipamentos Terroni Científico, LC 3000).

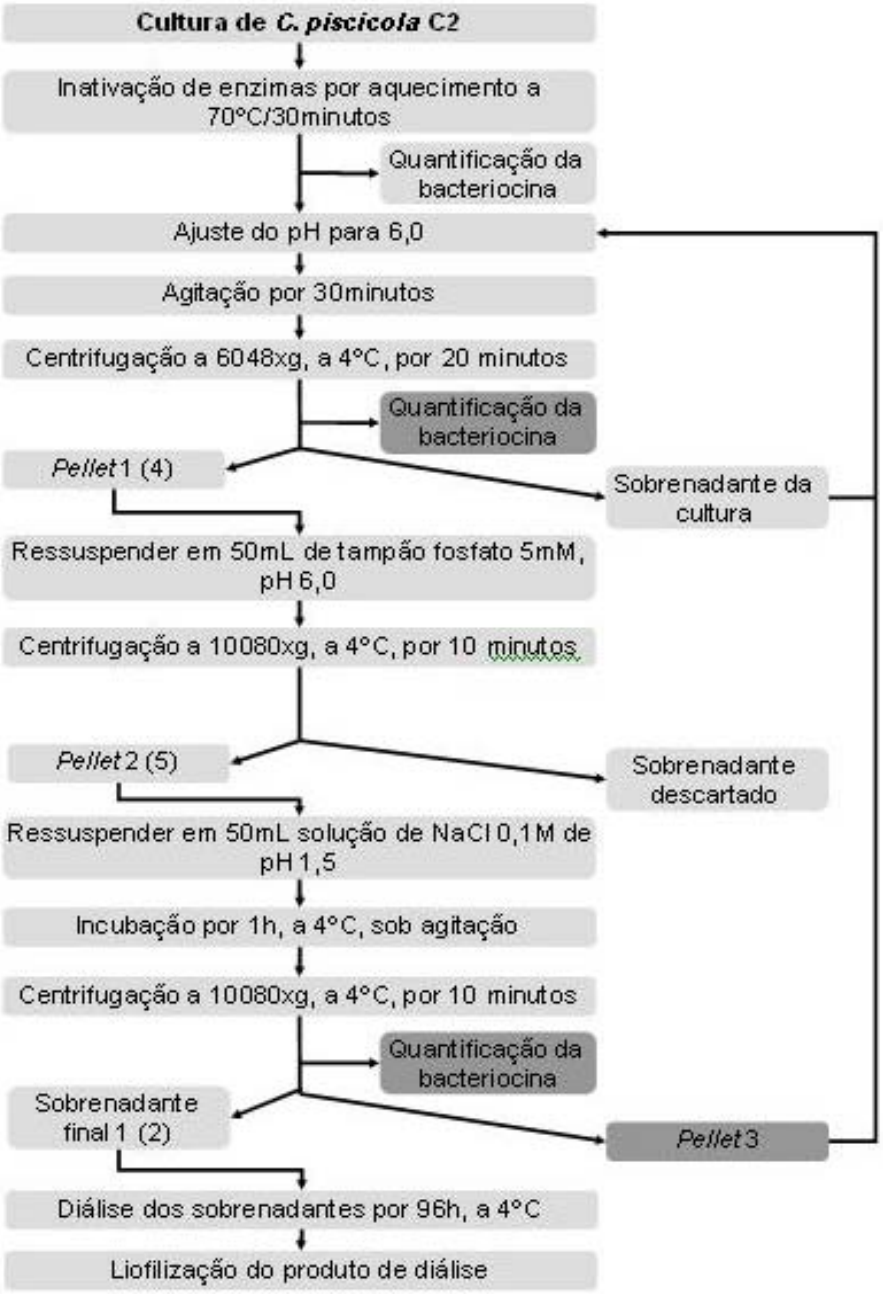

Figura 2. Representação esquemática das etapas realizadas na técnica de extração ácida otimizada (TULINI, 2008), para obtenção da bacteriocina semi-purificada de *Carnobacterium piscicola* C2. Os números em parênteses referem-se à segunda etapa da extração, onde o *pellet* 3 foi novamente ressuspendido no sobrenadante da cultura.

4.5 Quantificação de bacteriocina (modificado de Mayr-Harting, Hedges, Berkeley, 1972)

As amostras a serem quantificadas foram centrifugadas a 4ºC (Sorvall Legend Mach 1.6R) a 6048xg por 20 minutos, os sobrenadantes foram esterilizados por filtração em membrana com poros de 0,22 μm (GVWP, Millipore) e os filtrados foram armazenados em tubos esterilizados para posterior quantificação de bacteriocina.

Para quantificação de bacteriocina, em uma placa de ágar BHI (Oxoid) foi colocada uma sobrecamada de 7,5 ml de ágar BHI semi-sólido (caldo BHI adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico) contendo 10^5-10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes*.

As amostras foram diluídas em tampão fosfato na concentração de 10mM e pH 7,0, e foram feitas as diluições em placas de microtitulação de 96 poços (Costar) nas seguintes proporções: 1/1(sem diluição em tampão fosfato), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096, 1/8192.

Foram aplicados na superfície das placas 10 µL de cada diluição, por 5 vezes (totalizando 50µL), em intervalos de 5 minutos entre cada aplicação. As placas foram mantidas a 4ºC por 1h e em seguida incubadas a 37ºC por 18h-24h. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias por mL (UA/mL), considerando-se a recíproca da última diluição onde ocorreu inibição da multiplicação do indicador *L. monocytogenes*.

4.6 Estudo *in vitro* de sinergismo entre bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 e extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP)

Para verificar o possível sinergismo entre a atividade listeriana da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 e EAP foi determinada a concentração bactericida fracionada (CBF) em caldo BHI, de acordo com Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2009) com modificações.

Conforme esquematizado na figura 3, foram utilizadas placas de microtitulação com 96 poços (Costar). Inicialmente, 100 µL de caldo BHI contendo cerca de 10^5 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* foram adicionados a poços da placa de microtitulação. No pocinho da primeira linha da coluna 1 foram adicionados somente 100 µl de *L. monocytogenes* contendo cerca de 10^5 UFC/mL em caldo BHI, como controle positivo. Na primeira linha da microplaca, a partir da 2ª coluna foram adicionados 50 µL de cada concentração do extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (10-200 µL/mL) e 50 µL de água esterilizada, a fim de obter a CBM do extrato sozinho. Na primeira coluna, a partir da 2ª linha foram adicionados 50 µL de diferentes concentrações da bacteriocina semipurificada e liofilizada de *C. maltaromaticum* C2 (20-100 mg/mL) e 50 µL de água esterilizada, a fim de obter a CBM da bacteriocina sozinha. Nas demais linhas e colunas foram adicionadas diferentes combinações de EAP e bacteriocina, para obter-se a CBF das combinações frente a *L. monocytogenes*.

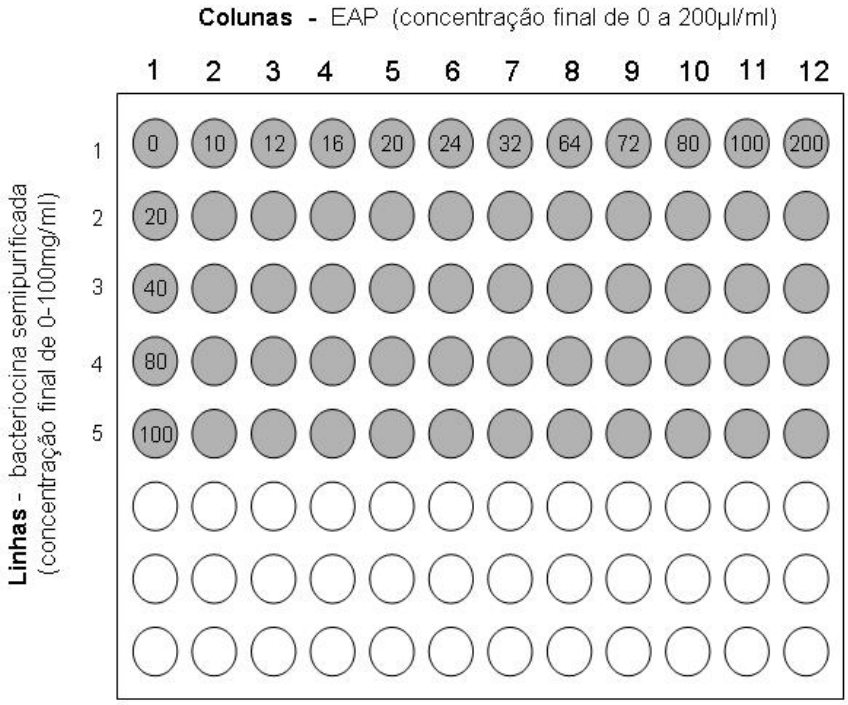

Figura 3. Representação esquemática da placa de microtitulação utilizada para a determinação da concentração bactericida fracionada (CBF) do extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP) e da bacteriocina semipurificada produzida por *C. maltaromaticum* C2 frente a *L. monocytogenes*.

As placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas e, decorrido o tempo de incubação, foram semeados em superfície de placas de ágar BHI 10 µL de cada combinação de EAP e de bacteriocina semipurificada para observação do crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 37ºC por 24h, e após esse tempo foi determinada CBF, definida como a menor concentração que inibe totalmente o crescimento bacteriano.

O índice da CBF foi calculado de acordo com Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), com modificações:

$\mathbf{CBF = CBF_{extrato} + CBF_{bacteriocina}}$, onde:

$CBF_{extrato} = (CBM_{extrato\ combinado} / CBM_{extrato\ sozinho})$

$CBF_{bacteriocina} = (CBM_{bacteriocina\ combinada} / CBM_{bacteriocina\ sozinha})$

Os resultados dos experimentos sobre sinergismo foram interpretados de acordo com Benabbou et al. (2009) como: sinergismo (CIF<0,5), adição (0,5≤CIF≤1), indiferente (1<CIF≤4) ou antagonismo (CIF>4). No entanto, nesse trabalho foi calculado o índice de concentração bactericida fracionada (CBF).

4.7 Desenvolvimento de sistemas modelo para estudos de bioconservação de pescados

4.7.1 Preparação de caldo de peixe modelo

A fim de mimetizar o ambiente encontrado em pescados, foi formulado um caldo de peixe modelo de acordo com Alves (2005), denominado Caldo de Peptona de Peixe (CPP), contendo 3,4% de peptona de peixe (Himedia), 4% de cloreto de sódio (Synth) e 0,5% de extrato de levedura (Oxoid).

O CPP foi esterilizado em autoclave a 121ºC durante 15 minutos, distribuído em alíquotas de 50ml em bolsas plásticas esterilizadas (Nasco) que foram mantidas sob refrigeração (4ºC) por até 24 horas para utilização nos experimentos.

CPP modificado (contendo 1% de cloreto de sódio) foi utilizado como caldo de pré-cultivo para as bactérias utilizadas em experimentos com pescado, para adaptação das culturas bacterianas à salina, pois em todos os sistemas de pescado foram adicionados NaCl 4%.

4.7.2 Enumeração da microbiota autóctone de filé de surubim defumado e embalado a vácuo

A determinação das populações de bactérias aeróbias e mesófilas totais e de bactérias láticas foi realizada, previamente ao preparo do caldo e do homogeneizado de surubim. Para isso, foram descongeladas sob refrigeração (5ºC), duas amostras de 100g cada por até 18h.

Foram retirados 10g de cada amostra, adicionados de 90 ml de solução salina peptonada esterilizada (0,85% de NaCl e 0,1% de peptona bacteriológica) e homogeneizados em um misturador de amostras por 60 segundos (Bag Mixer® Interscience 78860).

O homogeneizado foi utilizado para preparação de diluições decimais seriadas e 0,1 ml de cada diluição foi semeado em superfície em placas de ágar BHI (Oxoid), com incubação a 25ºC por 48h, para enumeração de bactérias aeróbias mesófilas totais. Para enumeração de bactérias láticas, 1 ml de cada diluição foi semeado por profundidade em ágar Nitrito Polimixina - NAP [ágar APT suplementado com nitrito de sódio (Synth); cicloheximida (Sigma); e polimixina-ß-sulfato (Inlab) segundo Davidson e Cronin (1973)] e as placas foram incubadas a 25ºC por 72h.

As amostras de filé de surubim também foram submetidas a teste imunológico para detecção de *Listeria* spp. utilizando o teste *Listeria* Rapid Test (Oxoid). Vinte e cinco gramas de cada amostra foram homogeneizados em 225 ml de Caldo Half Fraser adicionado do suplemento SR0166 (Oxoid) e incubados a 30ºC por 24h. Deste caldo, 0,1 ml foram inoculados em 10 ml de Caldo de Enriquecimento para

Listeria (BLEB) com suplemento de enriquecimento seletivo SR0141 (Oxoid) e incubados a 30ºC por até 24h.

Decorrido o tempo de incubação, 2 ml do BLEB foram retirados e aquecidos a 80ºC por 20 minutos, o caldo foi esfriado em temperatura ambiente e, posteriormente, foi realizado o teste.

Após resfriamento, 135 µl do caldo foram depositados na janela da amostra, conforme instruções do fabricante. Após 20 minutos, era observado se haveria formação de uma linha azul na janela de resultado.

Esse teste contém um anticorpo monoclonal específico para o antígeno flagelar B que está presente em espécies de *Listeria*. Quando a amostra é pipetada na janela da amostra sob um látex azul marcado com o anticorpo específico, se o antígeno está presente na amostra, é formado um complexo antígeno-anticorpo, que migra por capilaridade para a janela de resultado que contém uma linha imobilizada de anticorpo, formando assim uma linha azul, que é positiva para presença de *Listeria*.

Para confirmação do resultado do teste rápido, foram retirados 10µl do BLEB não tratado termicamente para realização de semeadura por esgotamento em superfície de ágar PALCAM (Oxoid) e as placas foram incubadas a 37ºC por 48h. Foi observado se havia presença de colônias típicas de *Listeria* sp., como colônias negras, convexas, sobre fundo negro.

4.7.3 Preparação do Caldo de surubim

Amostras comerciais de filé de surubim defumado, embalado a vácuo e pronto para o consumo foram utilizadas para o preparo do caldo de surubim.

O caldo de surubim foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Nilsson, Gram e Huss (1999) para o preparo de caldo de peixe. Para tanto, amostras de filé de surubim defumado foram cozidas por 10 minutos em água de torneira na proporção de 2:1 (peixe:água, p/p). As suspensões foram filtradas em filtros de papel e foram adicionadas de NaCl a 4% (p/v). Foi feita a adição de 5,98g/l de KH_2PO_4 (Synth) e de 9,75g/l de K_2HPO_4 (Merck), para tamponamento da suspensão e o pH foi ajustado para 6,2 com HCl 0,1M.

As suspensões foram aquecidas a 100ºC durante 30 minutos e divididas em alíquotas de 50 ml, transferidas para bolsas plásticas esterilizadas (Nasco "Stand-up", 118 ml) e mantidas refrigeradas (4ºC) por no máximo 24h antes dos experimentos de co-inoculação.

4.7.4 Preparação do homogeneizado de surubim

Filé de surubim defumado foi homogeneizado com 15 ml de solução de NaCl 4% (p/v) e homogeneizado por 2 minutos (Bag Mixer® Interscience). Segundo Alves et al. (2005), a solução salina continha populações bacterianas previamente cultivadas em CPP modificado e/ou 10 µl/ml de EAP, conforme descrito a seguir (tabela 2).

Porções de 10g de homogeneizados inoculados foram distribuídas em embalagens plásticas (Cryovac P7325B, média barreira) seladas a vácuo (Selovac 200B) e foram armazenadas a 5ºC.

4.7.5 Experimentos de co-inoculação

As culturas estoque congeladas de *L. monocytogenes* e de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^+$ e A9b$^-$), foram reativadas em caldo BHI. Alíquotas de 100 µl das culturas foram transferidas para CPP modificado e incubadas por 24h (25ºC para *C. maltaromaticum* e 37ºC para *L. monocytogenes*).

As culturas foram diluídas para fornecer 10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* e 10^5 UFC/mL de *C. maltaromaticum* no caldo de peixe modelo, caldo de surubim e homogeneizado de surubim nas condições descritas na tabela 2.

Em homogeneizado de surubim, foram realizados experimentos também com população nas condições da tabela 2, mas com menor população bacteriana (<10 UFC/mL de *L. monocytogenes* e 10^4 UFC/mL de *C. maltaromaticum*).

Os sistemas modelo preparados foram mantidos a 5ºC por até 5 semanas e foi realizada a enumeração de populações bacterianas no tempo zero, 24h e semanalmente.

Foram feitos três experimentos independentes para o caldo de peixe modelo e caldo de surubim, e os resultados foram expressos como média dos valores obtidos. O homogeneizado de surubim foi feito em duplicata para o experimento com menor população bacteriana e, foi realizado um único experimento para populações de 10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* e 10^5 UFC/mL de *C. maltaromaticum*.

Tabela 2. Combinações de *C. maltaromaticum* e extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP) frente a *L. monocytogenes* empregados nos estudos de co-inoculação em sistemas de pescado modelo incubados a 5ºC.

Experimentos	Combinações
1	*L. monocytogenes*
2	*C. maltaromaticum* C2
3	*C. maltaromaticum* A9b$^-$
4	*C. maltaromaticum* A9b$^+$
5	*L. monocytogenes* + 10µl/ml EAP
6	*C. maltaromaticum* C2 + 10µl/ml EAP
7	*C. maltaromaticum* A9b$^-$ + 10µl/ml EAP
8	*C. maltaromaticum* A9b$^+$ + 10µl/ml EAP
9	*L. monocytogenes* + *C. maltaromaticum* C2
10	*L. monocytogenes* + *C. maltaromaticum* A9b$^-$
11	*L. monocytogenes* + *C. maltaromaticum* A9b$^+$
12	*L. monocytogenes* + *C. maltaromaticum* C2 + 10µl/ml EAP
13	*L. monocytogenes* + *C. maltaromaticum* A9b$^-$ + 10µl/ml EAP
14	*L. monocytogenes* + *C. maltaromaticum* A9b$^+$ + 10µl/ml EAP

L. monocytogenes foi enumerada por semeadura em placas de ágar PALCAM (Oxoid) em superfície de diluições decimais seriadas (0,1 mL) com incubação a 37ºC por 48 h. As populações de *C. maltaromaticum* nos experimentos realizados em CPP e caldo de surubim foram enumeradas por semeadura em superfície de 0,1 mL das diluições apropriadas em placas ágar BHI, com incubação a 25ºC por 48 h.

As populações de *C. maltaromaticum* do experimento realizado em homogeneizado de surubim defumado a frio, artificialmente inoculado, foram

enumeradas em ágar NAP por semeadura em profundidade (1 ml) e as placas foram incubadas a 25ºC por 72h.

4.7.6 Verificação de produção de bacteriocina nos modelos de pescado

Para verificação de produção de bacteriocina em CPP, caldo de surubim e homogeneizado de surubim, foram retiradas porções de 1ml ou de 1g (homogeneizado de surubim) de cada um dos sistemas contendo *C. maltaromaticum* C2 e *C. maltaromaticum* A9b$^+$.

As amostras provenientes de CPP e do caldo de surubim foram centrifugadas a 6048xg por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 4ºC (Sorvall Legend Mach 1.6R), e em seguida foram esterilizadas por filtração através de membrana com poros de 0,22 μm (GVWP, Millipore), sendo mantidas a -20ºC.

Para amostras de homogeneizado de surubim, a quantificação de bacteriocina foi realizada de acordo com Alves (2005). Para isso, 1ml de solução de Tween 80 a 2,5% em tampão fosfato 0,01N (K_2PO_4) foi adicionado a 1g da amostra do homogeneizado de surubim e mantido por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 10,000xg durante 10 minutos, foi filtrada através de membrana com poros de 0,22 μm (GVWP, Millipore) e foi mantida a -20ºC.

As amostras filtradas foram utilizadas para quantificação de bacteriocina através da técnica de diluição crítica, conforme descrito no item 4.5.

4.7.7 Análise estatística

Os resultados das médias dos experimentos de três replicatas independentes de caldo de surubim e do caldo de peptona de peixe foram analisados estatisticamente através do programa GraphPad Prism® versão 5.0 pela análise de variância de duas vias ANOVA e pelo pós-teste Bonferroni, considerando como diferença significativa $P<0,05$.

Os experimentos com os homogeneizados de surubim foram realizados em duplicata para os testes com homogeneizados de surubim com inóculo menor (<10 UFC/ml para *L. monocytogenes* e 10^4 UFC/ml para *C. maltaromaticum*), e uma única vez para os outros homogeneizados de surubim.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

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

Na tabela 3 estão mostrados os valores obtidos de CIM e de CBM para extrato hidroalcoólico (EAP), óleo essencial (OEAP), extratos secos (E1 e E2) e micropartículas de óleo essencial (O1 e O2) de alecrim pimenta frente a *L. monocytogenes* a 37ºC por 24h. Na mesma tabela também estão apresentados os resultados obtidos de CIM e de CBM de EAP frente a *L. monocytogenes* a 5ºC por 12 dias e frente a *C. maltaromaticum* (C2, A9b^{+} e A9b^{-}) a 25ºC por 24h e a 5ºC durante 7 dias.

Tabela 3. Valores de CIM e de CBM (μg/mL) do extrato hidroalcoólico, do óleo essencial, dos extratos secos por *spray-drying*, e das micropartículas de óleo essencial secas por *spray-drying* de alecrim pimenta frente a diferentes bactérias sob diferentes condições de temperatura e tempo de incubação.

Preparação	Inóculo	Temperatura e Tempo de incubação	CIM (μg/mL)*	CBM (μg/mL)*
Extrato Hidroalcoólico (EAP)	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	1,34±0,63	1,34±0,63
		5ºC por 12 dias	0,89±0	1,34±0,63
	C. maltaromaticum C2	25ºC por 24h	0,89±0	2,67±0,47
		5ºC por 7 dias	0,89±0	1,78±0
	*C. maltaromaticum*A9b^{+}	25ºC por 24h	0,89±0	1,78±0
		5ºC por 7 dias	0,22±0	1,78±0
	C. maltaromaticum A9b^{-}	25ºC por 24h	0,89±0	1,78±0
		5ºC por 7 dias	0,45±0	1,78±0
Extrato seco (E1)	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	1600±0	4200±1,8
Extrato seco (E2)	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	1600±0	3100±0
Óleo Essencial (OEAP)	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	1,87±0	1,87±0
Micropartículas de óleo essencial (O1)	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	1700±0	3400±0
Micropartículas de óleo essencial (O2)	*L. monocytogenes*	37ºC por 24h	2000±0	4000±0

* Média ± desvio-padrão

Os resultados mostrados na tabela 3 revelaram valores iguais para CIM e CBM de EAP frente a *L. monocytogenes* a 37ºC. Sob refrigeração a CIM de EAP foi menor (0,89 μg/mL), indicando possível sinergismo de *L. monocytogenes*, mas o

mesmo efeito não foi observado considerando-se a CBM obtida com incubação a 5ºC por 12 dias.

Para *C. maltaromaticum* C2, foram encontrados valores de CIM de 0,89 μg/mL com incubação a 25ºC por 24h e a 5ºC por 7 dias. Para *C. maltaromaticum* A9b$^+$ e *C. maltaromaticum* A9b$^-$ a 25ºC foi de 0,89 μg/mL, mas sob refrigeração as CIM foram menores (tabela 3).

Na tabela 3, também pode ser observado que a CBM de EAP frente a todas as linhagens de *Carnobacterium* foi de 1,78 μg/mL, com exceção da condição com *C. maltaromaticum* C2 a 25ºC, que apresentou valor maior de CBM (2,67 μg/mL).

Neste trabalho, foi testada também a CIM e a CBM de OEAP frente a *L. monocytogenes,* sendo encontrado o valor de 1,87 μg/mL, para atividade inibitória e bactericida (tabela 3).

Para as preparações secas, foi observado que os extratos E1 e E2 apresentaram menor CIM quando comparados às micropartículas de óleo essencial (O1 e O2). A CBM de E2 foi menor que a CBM de O1, O2 e E1, mostrando que E2 apresentou maior efeito bactericida dentre os produtos secos de *L. sidoides* testados para inibição *L. monocytogenes* (tabela 3).

5.2 Quantificação da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2

Utilizando *L. monocytogenes* como indicador, foi observado que no caldo BHI (2000 ml) inoculado com *C. maltaromaticum* C2 e incubado por 18h houve produção de 160.000 UA de bacteriocina, correspondente a 80 UA/ml.

No volume final de 200 ml da preparação semi-purificada obtida (sobrenadante final 1 + sobrenadante final 2) a concentração de bacteriocina era de 80 UA/ml, fornecendo 16.000 UA, indicando rendimento de 10% na extração.

Os sobrenadantes finais liofilizados obtidos forneceram aproximadamente 300mg de pó liófilo e a atividade da bacteriocina era de 80 UA/100mg de pó. Considerando que o valor de CBM para bacteriocina semi-purificada obtido no estudo de sinergismo foi de 32 mg/ml e diante do rendimento obtido na extração ácida, não foi viável utilizar a bacteriocina nos experimentos de bioconservação, e foi decidido utilizar as culturas de *C. maltaromaticum* para esta finalidade.

5.3 Estudo de sinergismo

Através da técnica de microdiluição em caldo BHI, foram obtidos os valores da média da CBM de EAP sozinho (200 µl/ml), EAP combinado (10 µl/ml) e da CBM da bacteriocina semipurificada sozinha (32 mg/ml) e bacteriocina semipurificada combinada (28 mg/ml). A partir da fórmula demonstrada no item 4.6, foi calculado o valor da CBF de EAP combinado com a bacteriocina semipurificada de *C. maltaromaticum* C2 frente a *L. monocytogenes* de 0,95. De acordo com este valor, foi evidenciado que EAP combinado com a bacteriocina semipurificada de *C. maltaromaticum* C2 apresentou efeito aditivo frente a *L. monocytogenes*.

5.4 Experimentos de co-inoculação

5.4.1 Caldo de Peixe Modelo

Em CPP, a população de *L. monocytogenes* em monocultura atingiu cerca de 10^8 UFC/ml após 28 dias a 5ºC (figura 4), enquanto que as bactérias láticas alcançaram 10^8 UFC/ml após 14 dias de incubação, na mesma condição (figura 5).

Após 7 dias de incubação, as populações de *L. monocytogenes* sozinha e em co-cultura com *C. maltaromaticum* C2, ou *C. maltaromaticum* A9b$^-$, ou *C. maltaromaticum* A9b$^+$ eram de 10^3-10^4 UFC/ml. Após 14 dias, *L. monocytogenes* sozinha alcançou $6x10^6$ UFC/ml e *L. monocytogenes* em co-cultura com *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) 10^3-10^4 UFC/ml. No final dos 35 dias, as populações de *L. monocytogenes* sozinha e *L. monocytogenes* em co-cultura com *C. maltaromaticum* eram de 10^7-10^8 UFC/ml e não apresentaram diferença estatística significativa (P >0,05).

Não foi detectada a produção de bacteriocina por *C. maltaromaticum* C2 e *C. maltaromaticum* A9b$^+$ em CPP, e a inibição transitória de *L. monocytogenes* deve ter ocorrido provavelmente à competição por nutrientes.

As populações de *L. monocytogenes* no CPP a 5°C com EAP em co-cultura com *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) mantiveram-se entre <10^2 e 10^2 UFC/ml durante os 35 dias de experimento e não foi observado efeito sinérgico (figura 4).

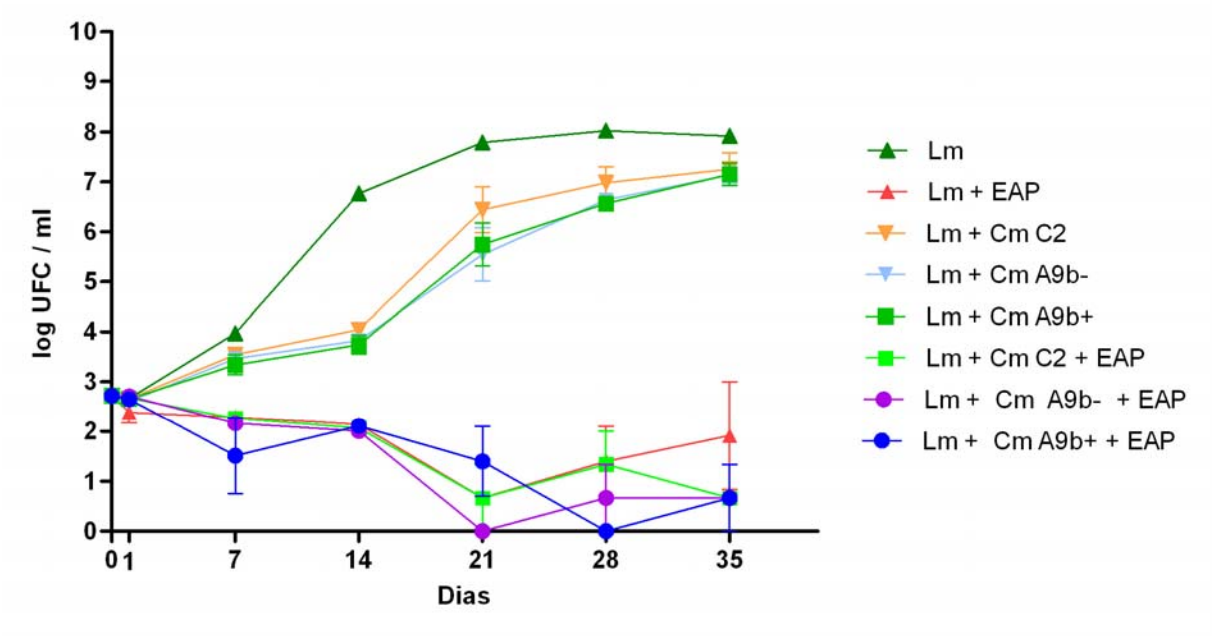

Figura 4. Médias das populações de *L. monocytogenes* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de peixe modelo mantidos a 5ºC.

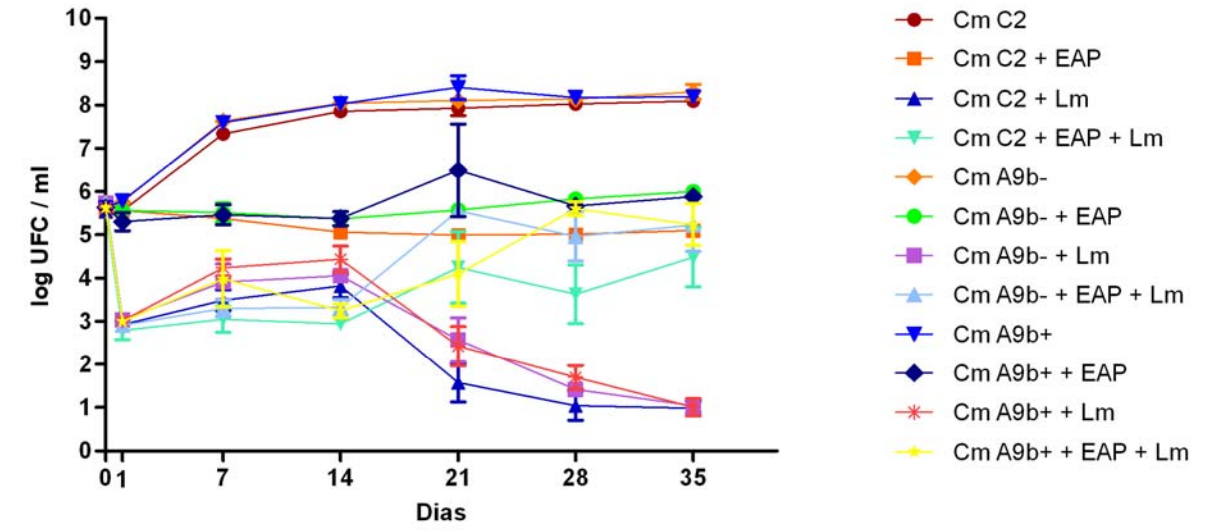

Figura 5. Médias das populações de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de peixe modelo mantidos a 5ºC.

Na figura 5, está mostrado que os isolados de *C. maltaromaticum* em CPP adicionado de EAP mantiveram uma população de aproximadamente 10^5 e 10^6 UFC/ml, comparados com 10^7-10^8 UFC/ml das monoculturas de *C. maltaromaticum.*

Na presença de *L. monocytogenes*, *C. maltaromaticum* foi inibido e apresentou população estimada de 10 UFC/ml no final dos experimentos (figura 5).

Nas condições de co-cultura com *L. monocytogenes* e adição de EAP, houve inibição de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) em 24h, mas essas bactérias láticas alcançaram entre 10^4 e 10^5 UFC/ml ao longo de 35 dias de armazenamento a 5ºC (figura 5).

5.4.2 Enumeração da microbiota autóctone de filé de surubim defumado embalado a vácuo

As amostras de filé de surubim defumado e embalado a vácuo apresentaram populações de bactérias aeróbias mesófilas de 10^6 UFC/g (1º lote) e 10^3 UFC/g (2º lote), enquanto que a enumeração de bactérias láticas mostrou populações de 10^3 UFC/g (1º lote) e 10^2 UFC/g (2º lote). Foi detectada a presença de *Listeria* spp. em amostra obtida do 1º lote de filé de surubim defumado e embalado à vácuo, mas bactérias deste gênero bacteriano estavam ausentes no 2° lote.

O filé de surubim do 1º lote foi utilizado nos experimentos de caldo de surubim, pois havia uma etapa de tratamento térmico no preparo deste sistema modelo, eliminando todas as bactérias presentes. Na preparação do homogeneizado de surubim não havia nenhum tratamento térmico e, portanto, para o seu preparo, foi utilizado surubim apenas do 2°lote.

5.4.3 Caldo de surubim

Em caldo de filé de surubim defumado e embalado a vácuo armazenado a 5ºC, as populações em monoculturas de *L. monocytogenes* alcançaram 10^8 UFC/ml após 21 dias, enquanto os isolados de *C. maltaromaticum* alcançaram esta mesma população após 7 dias (figuras 6 e 7).

Houve inibição estatisticamente significativa ($P<0,05$) de *L. monocytogenes* em cultura mista com *C. maltaromaticum* C2, atingindo população estimada de 10 UFC/ml no final do experimento, em comparação com as outras condições testadas. Entretanto, as populações de *L. monocytogenes* em co-cultura com os isolados *C. maltaromaticum* A9b$^-$ ou A9b$^+$ aumentaram e atingiram 10^4 UFC/ml, ao final de 35 dias de experimento, sem diferença estatística significativa, com $P>0,05$ (figura 6). Valores semelhantes (10^4 UFC/ml) foram obtidos para os caldos de surubim contendo EAP e culturas de *C. maltaromaticum* C2, A9b$^-$, ou A9b$^+$ (figura 6).

As culturas de *C. maltaromaticum* adicionadas de EAP multiplicaram-se rapidamente em caldo de surubim até o 7º dia de incubação e a população foi mantida em 10^8 UFC/ml até o final do período de incubação (figura 7).

Para as culturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$, ou A9b$^+$) co-cultivadas em caldo de surubim com *L. monocytogenes* (com e sem EAP) foi observado efeito inibitório, com populações semelhantes de bactérias láticas de 10^3-10^4 UFC/ml no final dos experimentos. Entretanto, houve diferença significativa ($P<0,05$) para *C. maltaromaticum* C2 sem EAP, que atingiu 10^8 UFC/ml após 35 dias de armazenamento a 5ºC (figura 7).

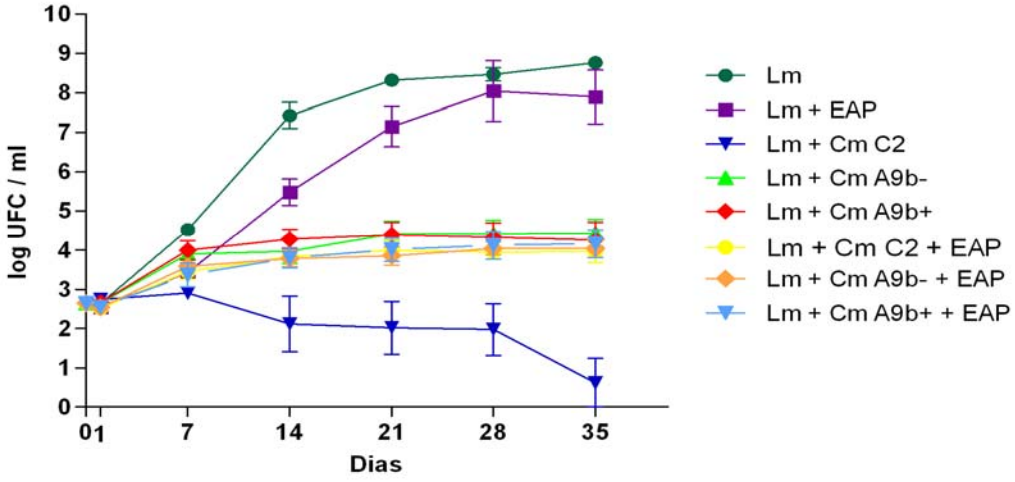

Figura 6. Médias das populações de *L. monocytogenes* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de surubim mantidos a 5ºC.

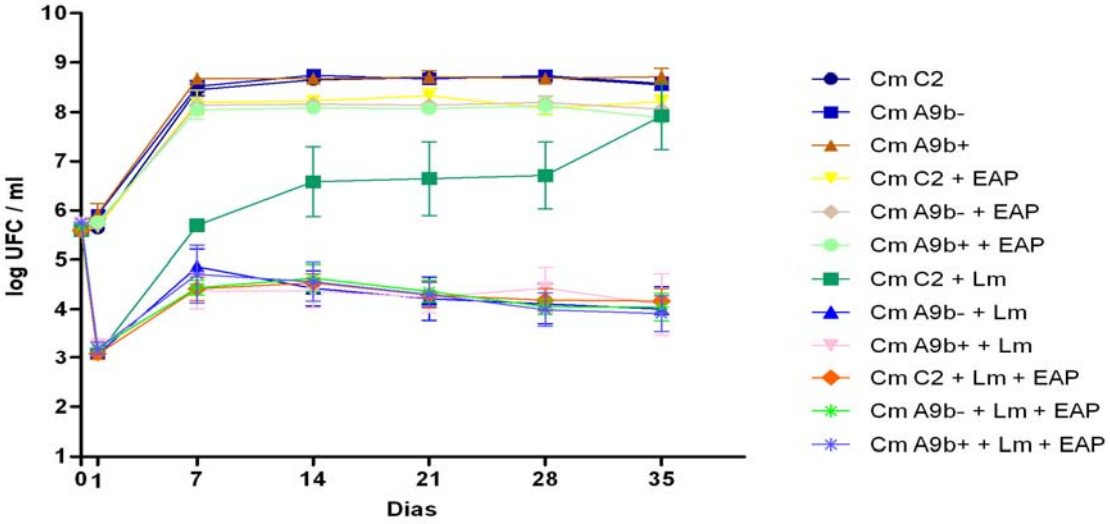

Figura 7. Médias das populações de *C. maltaromaticum* (log UFC/ml) em experimentos realizados em caldo de surubim mantidos a 5ºC.

C. maltaromaticum C2 em monocultura e em co-cultura com *L. monocytogenes*, produziu bacteriocina (20 UA/ml a 80 UA/ml) ativa frente a *L. monocytogenes*, a partir do 14º dia de incubação em caldo de surubim a 5ºC (figura 8). Não foi detectada a presença de bacteriocina nas outras condições de incubação

testadas para C. *maltaromaticum* C2 e também não houve produção de peptídeos antimicrobianos por C. *maltaromaticum* A9b$^+$.

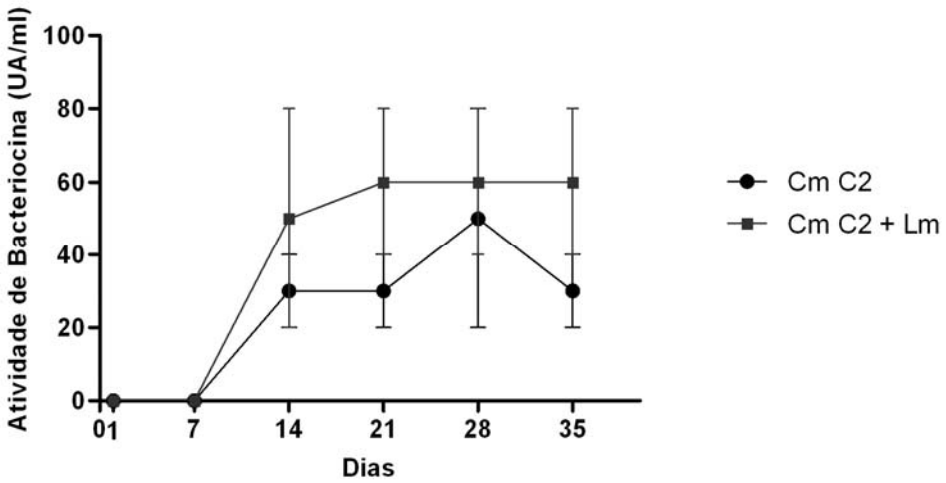

Figura 8. Produção de bacteriocina em caldo de surubim a 5ºC com monocultura de *C. maltaromaticum* C2 e com co-cultura de *C. maltaromaticum* C2 e *L. monocytogenes*.

5.4.4 Homogeneizado de surubim

No homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo inoculado apenas com 10^2 UFC/ml de *L. monocytogenes*, o número de células viáveis desta bactéria alcançou cerca de 10^6 UFC/ml após 28 dias de incubação a 5ºC (figura 9). Em monoculturas, também foi verificado que as linhagens *C. maltaromaticum* C2, A9b$^-$ e A9b$^+$ multiplicaram-se rapidamente a partir de inóculo inicial 10^5 UFC/ml, sendo encontradas populações de cerca de 10^7-10^8 UFC/ml de bactérias láticas após 28 dias de incubação (figura 10).

Quando foram realizadas co-culturas com *C. maltaromaticum* C2 ou A9b$^-$, sem adição de EAP, houve menor multiplicação de *L. monocytogenes* até 35 dias de incubação em comparação com o controle (cerca de 10^3 e 10^6 UFC/ml,

respectivamente). As populações de *L. monocytogenes* em co-cultura com *C. maltaromaticum* A9b$^+$ não apresentaram diferença ao longo dos 35 dias de experimento quando comparadas com a monocultura de *L. monocytogenes* (figura 9).

De acordo com a figura 9, nos homogeneizados de surubim inoculados com *L. monocytogenes* (10^2 UFC/ml) e adicionados de EAP (com e sem co-cultura com *C. maltaromaticum* A9b$^-$ ou A9b$^+$) foi observada forte inibição do patógeno desde o 1° dia, sendo que sua população permaneceu estimada como <10 UFC/ml durante os 35 dias de armazenamento a 5°C.

L. monocytogenes em cultura mista com *C. maltaromaticum* C2 em homogeneizado de surubim adicionado de EAP apresentou menor crescimento em relação ao controle (monocultura) até o 14º dia de incubação (<10 UFC/ml), mas após este período, foi observado um aumento da população listeriana, sendo detectadas 10^5 UFC/ml após 35 dias (figura 9).

Durante os 35 dias de incubação, não houve produção de bacteriocina nos homogeneizados de surubim inoculados com as cepas produtoras de bacteriocina *C. maltaromaticum* C2 e *C. maltaromaticum* A9b$^+$.

O homogeneizado de surubim sem inóculo e sem EAP apresentou populações iniciais de 10^2 UFC/ml de bactérias láticas, alcançando 10^8 UFC/ml após 28 dias de incubação a 5ºC (figura 10).

Com 14 dias de incubação no homogeneizado de surubim, as contagens de bactérias láticas nas condições inoculadas com as monoculturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) foram similares às populações de bactérias láticas presentes no homogeneizado sem inóculo (figura 10).

Nos homogeneizados de surubim inoculados somente com *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) havia 10^5 UFC/ml de bactérias láticas no tempo zero e, após 35 dias, foram atingidas populações 10^7-10^8 UFC/ml. A partir do 14º dia, as contagens de bactérias láticas nas condições inoculadas com as monoculturas de *C. maltaromaticum* foram similares às contagens do homogeneizado de surubim sem inóculo (figura 10).

Nas condições de co-inoculação de *L. monocytogenes* com as culturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ ou A9b$^+$), houve multiplicação de bactérias láticas semelhante às observadas para as monoculturas de carnobactérias, com populações de cerca de 10^8 UFC/ml após 35 dias de incubação (figura 10).

Na figura 10, está mostrado que na presença de EAP houve menor multiplicação de bactérias láticas no início dos experimentos (24 horas) com homogeneizado de surubim em todas as condições testadas. Entretanto, após 7 dias de incubação houve crescimento e foram alcançadas populações de bactérias láticas entre 10^7 e 10^8 UFC/ml (35 dias).

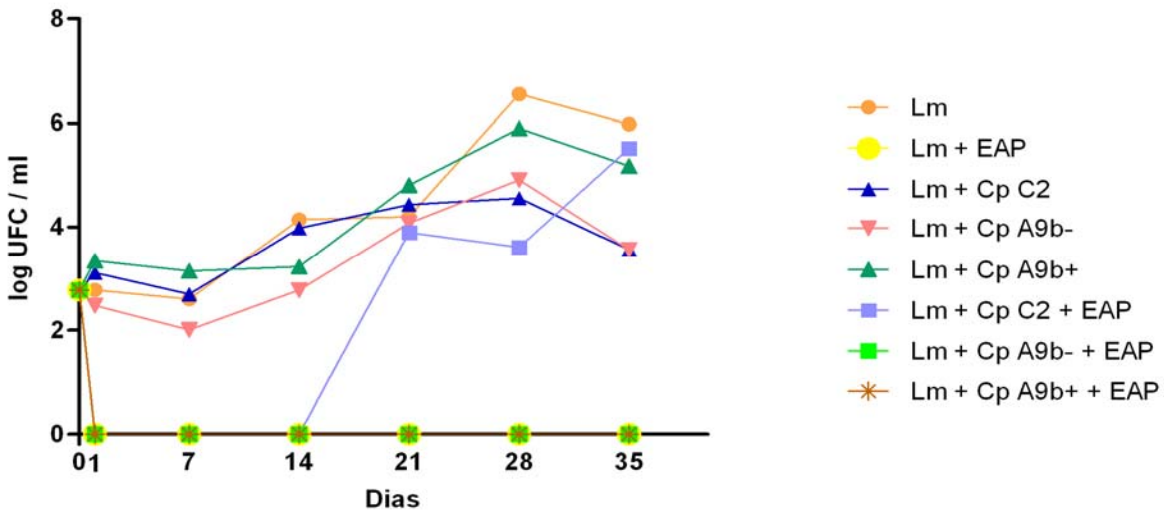

Figura 9. Populações de *L. monocytogenes* (log UFC/ml) em experimentos realizados em homogeneizado de surubim mantidos a 5ºC.

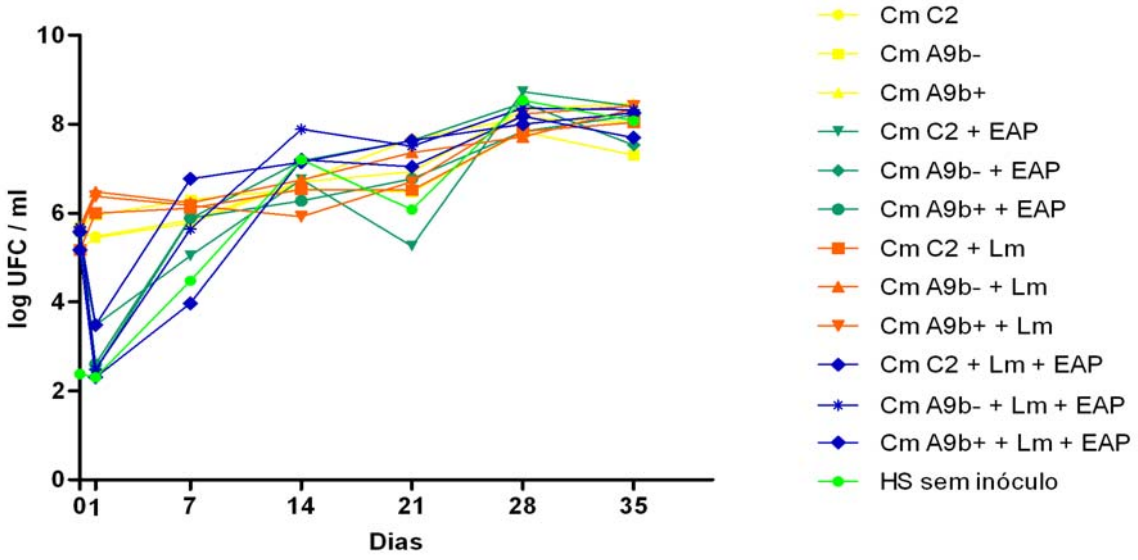

Figura 10. Médias das populações de bactérias láticas (log UFC/ml) em experimentos realizados em homogeneizado de surubim mantidos a 5ºC.

Neste trabalho também foi avaliado o efeito da adição de pequenos inóculos bacterianos em homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo [<10 UFC/ml (estimado) para *L. monocytogenes* e 10^4 UFC/ml para *C. maltaromaticum*]. Os resultados desses experimentos estão mostrados na tabela 5 e revelaram que *L. monocytogenes* em monocultura adicionada em níveis estimados (<10 UFC/ml) não foi detectada após 24h de incubação a 5ºC, mas alcançou 10^5 UFC/ml após 35 dias (tabela 5).

Após 35 dias de incubação, a população de *L. monocytogenes* em co-cultura com linhagens de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ ou A9b$^+$) foi apenas 1 log UFC/mL menor que o controle (*L. monocytogenes* sozinha). No entanto, em todas as condições onde foi adicionado EAP, o patógeno não foi detectado por até 35 dias.

Tabela 4. Média das populações (UFC/ml) de *Listeria monocytogenes* inoculada (<10 UFC/ml) em homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo e armazenado a 5ºC, determinadas por semeadura direta em superfície (0,1ml) em placas de ágar PALCAM e incubadas a 37°C por 48h.

Condições	**tempo**		
	0 h	**24h**	**35 dias**
Lm*	<10	<10	$6,8x10^5$
Lm + EAP*	<10	<10	<10
Lm + Cm C2*	<10	<10	$3,7x10^5$
Lm + Cm A9b^{-*}	<10	<10	$9,1x10^5$
Lm + Cm A9b^{+*}	<10	<10	$4,3x10^4$
Lm + Cm C2 + EAP*	<10	<10	<10
Lm + Cm A9b$^-$ + EAP*	<10	<10	<10
Lm + Cm A9b$^+$ + EAP*	<10	<10	<10

*EAP = Extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta; Lm = *L. monocytogenes*; Cm C2 = *C. maltaromaticum* C2; Cm A9b$^-$ = *C. maltaromaticum* A9b$^-$; Cm A9b$^+$ = *C. maltaromaticum* A9b$^+$.

Com 24h de incubação, as populações de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ ou A9b$^+$) em monoculturas e em co-culturas com *L. monocytogenes,* no homogeneizado de surubim sem adição de EAP, não apresentaram redução na multiplicação de bactérias láticas, mantendo o nível populacional de 10^4 UFC/ml (tabela 6).

No entanto, as condições tanto em monoculturas de *C. maltaromaticum* quanto em co-culturas com adição de EAP apresentaram redução da multiplicação de bactérias láticas, reduzindo as populações entre 10 e 10^3 UFC/ml após 24h de incubação a 5ºC, sendo que as cepas produtoras de bacteriocina (C2 e A9b$^+$) foram as mais inibidas (tabela 6).

Após 35 dias de incubação, as populações de bactérias láticas em homogeneizado de surubim com inóculo inicial menor (10^4 UFC/ml de *C.*

maltaromaticum) alcançaram entre 10^7 e 10^8 UFC/ml em todas as condições testadas (tabela 6).

Além disso, foi observado que a quantidade inicial de bactérias láticas no homogeneizado sem inóculo foi de 10^2 UFC/ml e, que ao final dos 35 dias de incubação alcançou 10^8 UFC/ml (tabela 6).

Tabela 5. Média de populações de bactérias láticas (UFC/ml) em homogeneizado de filé de surubim defumado e embalado a vácuo a 5ºC, determinadas por semeadura por profundidade (1ml) em placas de ágar NAP e incubadas a 25°C por 48h.

Condição	0	24h	35 dias
Cm C2*	$3,1x10^4$	$3,1x10^4$	$4,1x10^8$
Cm A9b^{-*}	$5,1\ x10^4$	$9,1\ x10^4$	$1,5x10^8$
Cm A9b^{+*}	$3,9\ x10^4$	$5,7\ x10^4$	$2,1x10^8$
Cm C2 + EAP*	$3,1\ x10^4$	$1,6x10^3$	$4,2x10^8$
Cm A9b$^-$ + EAP*	$5,1\ x10^4$	$2,1\ x10^4$	$2x10^8$
Cm A9b$^+$ + EAP*	$3,9\ x10^4$	$4,7x10^2$	$2,4x10^8$
Cm C2 + Lm*	$3,1\ x10^4$	$5,0\ x10^4$	$2,2x10^8$
Cm A9b$^-$ + Lm*	$5,1\ x10^4$	$3,7x10^5$	$8x10^7$
Cm A9b$^+$ + Lm*	$3,9\ x10^4$	$6,2x10^4$	$3,4x10^8$
Cm C2 + Lm + EAP*	$3,1\ x10^4$	$1,4x10^2$	$4,3x10^8$
Cm A9b$^-$ + Lm + EAP*	$5,1\ x10^4$	$2,5x10^3$	$1,6x10^8$
Cm A9b$^+$ + Lm + EAP*	$3,9\ x10^4$	$4,2x10^2$	$2,0x10^8$
HS sem inóculo bacteriano*	$6,8x10^2$	$8,0x10^2$	$1,4x10^8$

* HS = homogeneizado de surubim; EAP = Extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta; Lm = *L. monocytogenes*; Cm C2 = *C. maltaromaticum* C2; Cm A9b$^-$ = *C. maltaromaticum* A9b$^-$; Cm A9b$^+$ = *C. maltaromaticum* A9b$^+$.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho sobre atividade antilisteriana de preparações de alecrim pimenta, foram utilizados ensaios de macrodiluição e foi obtido um valor maior de CIM de EAP para inibir *L. monocytogenes* a 37ºC do que em temperatura de refrigeração. Campo, Amiot e Nguyen-The (2000) também observaram que em baixas temperaturas (4 e 10ºC comparado com 30ºC), houve maior efeito inibitório de extrato comercial de alecrim (Oxy'less) frente a *L. monocytogenes*.

Os valores de CIM de EAP frente a *L. monocytogenes* a 37ºC mostrados na tabela 3 correspondem a 1,34 µg/ml (ou 1,2%), e foram semelhantes aos valores de CIM do extrato etanólico comercial de alecrim (Oxy'less) encontrados por Campo, Amiot e Nguyen-The (2000). Nasar-Abbas e Kadir Halkman (2004) estudaram o efeito inibitório para o extrato aquoso da planta sumagre (*Rhus coriaria L.*) frente a *L. monocytogenes* e também encontraram resultados semelhantes aos do presente trabalho.

O efeito bactericida de EAP frente a *C. maltaromaticum* A9b$^-$ e de *C. maltaromaticum* A9b$^+$ foi semelhante a 5ºC e a 25ºC, mas *C. maltaromaticum* C2 foi mais inibido por EAP em temperatura de refrigeração (tabela 3).

A ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *L. sidoides* foi também estudada por Nunes et al. (2005), que demonstraram por meio de ensaios de difusão em discos que a atividade antimicrobiana do extrato obtido a partir das folhas e inflorescências de *L. sidoides,* foi ativo frente a diferentes cepas de *Streptococcus mutans*.

Outras atividades biológicas do óleo essencial de *L. sidoides* também já foram investigadas, incluindo atividade antimicrobiana frente a *Streptococcus* e *Candida*

albicans (Botelho et al., 2007a), antioxidante (MONTEIRO et al., 2007), antifúngica (FONTENELLE et al., 2007) e larvicida (CARVALHO et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2004).

Os valores de CIM e de CBM do óleo essencial de *L. sidoides* frente a *L. monocytogenes* encontrados nesse trabalho foram de 1,87 μg/mL (ou 1870 mg/mL), sendo diferentes dos valores encontrados por Botelho et al. (2007a). Aqueles autores demonstraram a ação antibacteriana do óleo essencial de *L. sidoides* e encontraram valores de CIM frente a diferentes espécies de *Streptococus* spp. entre 5-10 mg/mL e CBM entre 20-40 mg/mL.

Entretanto, o valor da CIM de 1,87 μg/mL (2 μl/mL) do óleo essencial de *L. sidoides* encontrado nesse trabalho é mais próximo ao valor relatado por Oliveira et al. (2006), que determinaram a CIM de 0,4 μl/mL para o óleo essencial de *L. sidoides* frente a diferentes isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Ficou evidente que diferentes gêneros de bactérias podem apresentar variação na sensibilidade ao extrato e ao óleo essencial de alecrim pimenta e que devem ser estudados microrganismos específicos para cada aplicação de interesse.

Além das preparações líquidas de alecrim pimenta (EAP e OEAP) frente a *L. monocytogenes*, neste trabalho também foram avaliadas as ações antimicrobianas de preparações de alecrim pimenta secas por *spray-drying*.

Segundo Oliveira, Bott e Souza (2006), as vantagens da utilização de extratos secos de plantas em comparação com extratos líquidos convencionais são o baixo custo de estocagem, maior concentração do produto e estabilidade das substâncias ativas.

Existem poucas informações na literatura sobre o uso de extratos ou de óleo essenciais de plantas microencapsulados por *spray-drying* e sua atividade antimicrobiana.

Em um trabalho realizado por Tedeschi et al. (2007), foi avaliada a ação antifúngica de extrato etanólico de alho microencapsulado por *spray-drying*, e foi encontrada atividade fungicida com 1,5 g/10mL frente a *Fusarium avenaceum.*

Fernandes et al. (2008), demonstraram a atividade antifúngica das micropartículas de óleo essencial de alecrim pimenta (O1 e O2) frente a diferentes isolados de *Candida* spp., através do método de difusão em poço. Aqueles autores relataram que as micropartículas O2 apresentaram maior atividade antifúngica, com halos de inibição entre 11-16 mm comparada com as micropartículas de O1 que apresentaram halos entre 11-12 mm.

Neste trabalho, foi observado que os extratos secos e as micropartículas de óleo essencial de *L. sidoides* apresentaram uma atividade inibitória frente a *L. monocytogenes* aproximadamente 1000 vezes menor quando comparados com EAP (1,34 μg/mL) e com OEAP (1,87 μg/mL) (tabela 3). Essa diferença de atividade encontrada entre os extratos secos e micropartículas do óleo essencial de EAP e OEAP pode ser atribuída provavelmente à perda de compostos voláteis com atividade antimicrobiana durante o processo de secagem por *spray-drying*, ou pode ser decorrente de uma menor estabilidade das preparações secas por *spray-drying* em comparação com EAP e OEAP.

Os resultados deste estudo também revelaram que EAP apresentou menor CIM e menor CBM frente a *L. monocytogenes* do que OEAP, indicando que EAP tem maior potencial no controle da multiplicação deste patógeno.

Na realização de experimentos de co-inoculação deste projeto, foi escolhido o EAP, pois foi a preparação com maior efeito inibitório (menor CIM e menor CBM), além de ter demonstrado sinergismo com a temperatura de refrigeração para inibição de *L. monocytogenes*.

Devido à observação que os isolados de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) eram sensíveis à ação de EAP, foi proposta a extração da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 e liofilização da preparação semipurificada, para utilizar nos experimentos de co-inoculação.

No entanto, houve pequeno rendimento na extração da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2, a média do valor de CBM para bacteriocina através da técnica de microdiluição foi de 32 mg/ml frente a *Listeria monocytogenes*. Após a determinação da CBM da bacteriocina concluiu-se que seriam necessárias várias extrações da bacteriocina para se obter uma quantidade suficiente de bacteriocina semipurificada para utilizá-la nos experimentos de co-inoculação de pescados, e isso invibializou a utilização da bacteriocina semipurificada nos experimentos, conforme planejado inicialmente.

Deste modo, nos estudos da atividade antilisterial do pó semipurificado da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 foram realizados pela técnica de microdiluição. Foi observado que com a técnica de microdiluição, EAP apresentou CBM frente a *L. monocytogenes* maior (200 µl/ml) do que a encontrada pelo método da macrodiluição em tubos de vidro (10 µl/ml). Um fator que pode ter contribuído para essa diferença é a superfície de contato com os caldos: que foi diferente para as duas técnicas, sendo vidro para a técnica de macrodiluição e plástico para a técnica de microdiluição. É provável que tenha ocorrido diferença na adsorção de

componentes de EAP a esses materiais, pois havia tingimento do material plástico usado nos ensaios.

O resultado do estudo de sinergismo para verificar a concentração bactericida fracionada (CBF) da bacteriocina semipurificada de *C. maltaromaticum* C2 combinada com EAP frente a *L. monocytogenes* indicou que a aplicação desses dois antimicrobianos naturais teve um efeito aditivo (CBF = 0,95) frente à bactéria patogênica como indicado pela diminuição da CBM de cada agente antimicrobiano combinado.

Em um trabalho recente publicado por Benabbou et al. (2009), foi avaliado o sinergismo entre a bacteriocina divergicina M35 produzida por *Carnobacterium divergens* e o biopolímero quitosana (derivado de crustáceos). Por meio da técnica de concentração inibitória fracionada (CIF), foi demonstrado que houve efeito aditivo na utilização desses dois compostos frente a *L. monocytogenes*. Aqueles autores propuseram que a ação desses antimicrobianos sobre *L. monocytogenes* ocorria pela formação de poros na membrana celular (divergicina) e formação de uma barreira sobre a parede celular, impedindo a entrada de nutrientes na célula (quitosana).

Olasupo et al. (2004) estudaram diferentes combinações da bacteriocina nisina com carvacrol, ou eugenol, ou timol, através da determinação da concentração inibitória fracionada (CIF). Foi demonstrado que ocorreu sinergismo entre essas combinações frente a *Listeria innocua* e *Bacillus subtilis*. No entanto, naquele mesmo trabalho foi observada ação antagônica na combinação entre nisina e diacetil frente a *B. subtilis* e *L. innocua*.

Neste trabalho, foi observado que nos experimentos de co-inoculação, EAP apresentou efeitos inibitórios diferentes nos sistemas de pescado. Em CPP, EAP

mostrou forte atividade inibitória frente a *L. monocytogenes* e frente aos isolados de *C. maltaromaticum,* tanto nas monoculturas quanto nas co-culturas (figuras 4 e 5).

No caldo de surubim, EAP não apresentou efeito inibitório frente a monocultura de *L. monocytogenes* e de isolados de *C. maltaromaticum*, provavelmente os componentes antimicrobianos de EAP podem ter tido sua eficácia diminuída frente a essas bactérias na presença de algum componente do surubim. No entanto, EAP teve efeito inibitório frente a *L. monocytogenes* e aos isolados de *C. maltaromaticum* em co-culturas (figuras 6 e 7), o que pode ser atribuído à atuação inibitória simultânea de EAP e da competição por nutrientes.

De acordo com Burt (2004), em pescados pode ocorrer a presença de altos níveis de gordura, o que pode favorecer a redução da efetividade de antimicrobianos como os óleos essenciais.

No homogeneizado de surubim, EAP apresentou ação inibitória frente a *L. monocytogenes* sozinha e frente às co-culturas de *L. monocytogenes* com *C. maltaromaticum* A9b$^-$ ou *C. maltaromaticum* A9b$^+$, não sendo detectado o patógeno desde 24h de inoculação até o final dos experimentos (<10 UFC/ml).

Por outro lado, EAP combinado com a co-cultura de *L. monocytogenes* e *C. maltaromaticum* C2 no homogeneizado de surubim, apresentou populações de *L. monocytogenes* <10 UFC/ml apenas no início do experimento, mas após 21 dias, *L. monocytogenes* apresentou rápida multiplicação, alcançando cerca de 10^5 UFC/ml após 35 dias (figura 9). Uma hipótese para o resultado observado é que tenha ocorrido no início do experimento a seleção de microrganismos resistentes à ação inibitória da bactéria lática e de EAP, e que essa população tenha se multiplicado e atingido valores de cerca de 10^5 UFC/ml. Entretanto, para esclarecer essa possibilidade, há necessidade de realização de novos experimentos.

A população de bactérias láticas do surubim sem inóculo e sem EAP inicialmente continha 10^2 UFC/ml, alcançando 10^8 UFC/ml (figura 9). Esse resultado indica que as bactérias láticas que cresceram nas monoculturas não foram somente as linhagens de *C. maltaromaticum* inoculadas no homogeneizado de surubim. Provavelmente existia uma mistura da microbiota acompanhante de bactérias láticas com os isolados de *C. maltaromaticum* inoculados em cada condição.

Com 24h de incubação, tanto na condição de monoculturas quanto nas co-culturas de *C. maltaromaticum* combinadas com EAP, houve inibição das populações de bactérias láticas no homogeneizado de surubim. Posteriormente, o número de bactérias láticas nas amostras sem inoculo alcançaram os mesmos números de bactérias láticas encontrados para monoculturas de *C. maltaromaticum* sem adição de EAP (figura 10). Provavelmente, no início do experimento, os isolados de *C. maltaromaticum* foram inibidos por EAP, baixa temperatura e também por competição por nutrientes, quando em co-cultura.

Em CPP, *L. monocytogenes* combinada com *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) apresentou multiplicação lenta no início do experimento, mas ao final dos 35 havia populações próximas às de *L. monocytogenes* em monocultura (10^7-10^8 UFC/ml), sem diferença estatisticamente significativa, $P<0,05$ (figura 4). *C. maltaromaticum* em cultura mista sem EAP foi inibido durante 35 de incubação, com populações finais de cerca de 10 UFC/ml (figura 5), provavelmente devido à competição por nutrientes.

Alves et al. (2005), observaram que em caldo de peixe modelo, *C. piscicola* A9b$^-$ e A9b$^+$ em co-cultura com *L. monocytogenes* V2 (sorogrupo 1) também apresentaram pouco efeito inibitório, e o patógeno alcançou cerca de 10^7 UFC/ml ao final de 14 dias de experimento realizado a 10ºC. No entanto, diferentemente do que

foi observado no presente trabalho, as populações de *C. piscicola* A9b$^-$ e A9b$^+$ não foram inibidas pela multiplicação de *L. monocytogenes* V2, e alcançaram cerca de 10^8 UFC/ml após 4 dias de incubação a 10ºC. Alves et al. (2005), também observaram que em caldo de peixe modelo, *C. piscicola* C2 apresentou potencial efeito inibitório frente a *L. monocytogenes* V2 mantida a 10°C e foi detectada a produção de bacteriocina. No presente trabalho, não foi observada produção de bacteriocina por nenhuma das linhagens bacteriocinogênicas (C2 e A9b$^+$) em caldo de peixe modelo (CPP), o que pode ter ocorrido devido à utilização de menor temperatura de incubação (5ºC).

Neste trabalho, no caldo de surubim, a utilização de co-culturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) inibiu *L. monocytogenes* em relação ao controle (monocultura de *L. monocytogenes*), sendo observada maior atividade por *C. maltaromaticum* C2 e produção de bacteriocina. Essa diferença na atividade inibitória provavelmente devido à produção de bacteriocina, também foi observada por Alves et al. (2005) em caldo de surubim mantido a 10ºC por 14 dias. Aqueles autores demonstraram que *C. piscicola* C2 e *C. piscicola* A9b$^+$ produziram bacteriocina e inibiram *L. monocytogenes* V2, enquanto que a linhagem não-bacteriocinogênica *C. piscicola* A9b$^-$ apresentou menor efeito inibitório. Duffes et al. (1999a), Duffes et al. (1999b) e Vescovo, Scolari e Zacconi (2006) também observaram o papel de carnobactérias produtoras de bacteriocinas na inibição de *L. monocytogenes* em sistemas modelo de pescados em temperatura de refrigeração.

Neste trabalho a produção de bacteriocina foi verificada somente por *C. maltaromaticum* C2, em caldo de surubim. Entretanto, ocorreu inibição da produção na presença de EAP em todas as condições estudadas. Na literatura, há relato que a co-cultura de uma linhagem produtora de bacteriocina com uma linhagem sensível,

pode induzir a produção do peptídeo antimicrobiano (LEISNER et al., 2007). Este efeito foi aqui observado para *C. maltaromaticum* C2, pois houve maior produção de bacteriocina em cultura mista com *L. monocytogenes* do que em monocultura.

Alguns autores demonstraram a ocorrência de resistência a bacteriocinas em *L. monocytogenes* e sugeriram que devido a isso, o uso de bactérias láticas não-bacteriocinogênicas poderia apresentar vantagens para bioconservação em alimentos prontos para o consumo (NILSSON et al., 2004; VERMEIREN et al., 2006). Entretanto, no presente trabalho não foi observada a ocorrência de resistência de *L. monocytogenes* à bacteriocina produzida por *C. maltaromaticum* C2, pois a população de listeria permaneceu inibida durante todo o experimento.

No homogeneizado de surubim, em culturas mistas com *C. maltaromaticum* C2 ou com *C. maltaromaticum* A9b$^-$, a população final de *L. monocytogenes* foi cerca de 2 log de UFC/ml menor que *L. monocytogenes* sozinha, enquanto que *C. maltaromaticum* A9b$^+$ teve pequeno efeito inibitório (figura 9). Entretanto, em estudos com caldo de salmão defumado armazenado a 5ºC por 21 dias, Nilsson et al. (2004), encontraram resultados diferentes, observando que os níveis populacionais de *L. monocytogenes* foram reduzidos cerca de 6 log de UFC/g na presença *C. piscicola* A9b$^+$ e 3 log de UFC/g na presença de *C. piscicola* A9b$^-$.

Corroborando os estudos do presente trabalho, Alves et al. (2005) também relataram que não foi detectada a produção de bacteriocina por nenhuma linhagem bacteriocinogênica de *C. maltaromaticum* (C2 e A9b$^+$) em homogeneizado de surubim defumado mantido sob refrigeração. Resultados semelhantes foram observados por Nilsson, Gram e Huss (1999), que também não verificaram a produção de carnobacteriocina B2 por *C. piscicola* A9b$^+$ em salmão defumado a frio e armazenado a 5ºC.

Essa diferença na produção de bacteriocinas por bactérias láticas em matrizes alimentares diversas pode ser atribuída a fatores intrínsecos do alimento, reforçando a idéia de que as linhagens a serem utilizadas em bioconservação devem preferencialmente ser isoladas dos alimentos em que se pretende utilizá-las (BREDHOLT, NESBAKKEN, HOLCK, 1999; DE MARTINIS et al. 2002; GÄNZLE, WEBER, HAMMES, 1999).

Neste trabalho, os resultados dos experimentos com homogeneizado de surubim com pequenos inóculos bacterianos revelaram que *L. monocytogenes* foi inibida por EAP em mono e em co-cultura. Entretanto, neste mesmo sistema modelo na ausência de EAP, *L. monocytogenes* inoculada em populações estimadas abaixo de 10 UFC/ml foi capaz de atingir 10^5 UFC/ml sob refrigeração dentro de 35 dias, indicando o potencial de pescados minimamente processados como veículos dessa bactéria patogênica.

Na literatura, a maioria dos trabalhos sobre efeito antimicrobiano combinado de peptídeos e compostos derivados de plantas foram feitos com a bacteriocina nisina em meios de cultura, evidenciando a necessidade de estudos com bactérias láticas e extratos naturais em matrizes alimentícias. Altieri et al. (2005) demonstraram que o uso de culturas de *Bifidobacterium bifidum*, timol e armazenamento em baixa temperatura em pescado aumentaram a eficácia no controle da multiplicação de bactérias deteriorantes, como *Pseudomonas* sp. e *Photobacterium phosphoreum*. No presente, nos sistemas modelo de pescado estudados, não foi observado efeito sinérgico no uso combinado de EAP e bactérias com potencial bioconservador, mas foi demonstrada importante atividade antilisteriana de preparações de alecrim pimenta, encorajando novos estudos nesta linha de pesquisa.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- ✓ O extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta (EAP) exerceu efeito bactericida frente a *Listeria monocytogenes* a 37ºC e a 5ºC, e também frente aos isolados de *Carnobacterium maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) a 25ºC e a 5ºC, em meio de cultura.

- ✓ Houve sinergismo com EAP e temperatura de refrigeração (5º) para inibição de *L. monocytogenes* e das linhagens de *C. maltaromaticum*.

- ✓ O óleo essencial de alecrim pimenta (OEAP) apresentou efeito inibitório frente a *L. monocytogenes* a 37ºC, em meio de cultura, com potencial para utilização na bioconservação de alimentos.

- ✓ Os extratos secos por *spray-drying* (E1 e E2) e as micropartículas de óleo essencial secas por *spray-drying* (O1 e O2) apresentaram pouco efeito inibitório frente a *L. monocytogenes* a 37ºC, apresentando uma atividade inibitória mil vezes menor quando comparados com EAP e OEAP.

- ✓ O uso combinado da bacteriocina semipurificada e liofilizada produzida por *C. maltaromaticum* C2 com EAP demonstrou efeito aditivo na inibição de *L. monocytogenes* em meio de cultura a 37ºC.

- ✓ A extração, purificação e liofilização da bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2 proporcionaram baixo rendimento e não foi viável realizar estudos de bioconservação com a bacteriocina semi-purificada.

- ✓ O uso de EAP e de culturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) apresentou diferentes efeitos inibitórios frente a *L. monocytogenes* nos sistemas modelo de pescado analisados a 5°C.

- ✓ A produção de bacteriocina por *C. maltaromaticum* C2 em caldo de surubim sem EAP foi importante na inibição de *L. monocytogenes*.

- ✓ EAP demonstrou importante efeito inibitório de *L. monocytogenes* em pescado e tem potencial para ser utilizado na garantia da inocuidade desses produtos.

- ✓ Não foi observado sinergismo na inibição de *L. monocytogenes* com o uso combinado das culturas de *C. maltaromaticum* (C2, A9b$^-$ e A9b$^+$) e EAP, em nenhum alimento modelo estudado.

- ✓ *L. monocytogenes* inoculada com populações estimadas (< 10 UFC/ml) em sistema modelo de pescado multiplicou-se e atingiu altas populações dentro de 35 dias em temperatura de refrigeração, ressaltando que pescados prontos para o consumo são alimentos com potencial de veiculação deste patógeno.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

AHN, J.; GRU, I. U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, v.24, p.7-14, 2007.

ALLENDE, A. et al. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes in vitro* and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiology**, v.24, p.759-766, 2007.

ALTIERI, C. et al. Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.1294-1302, 2005.

ALVES, V. F. **Ocorrência e controle de *Listeria monocytogenes* em pescado minimamente processado.** 2005. 104f. Tese (Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

ALVES, V. F. et al. Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from Brazilian smoked fish (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from surubim. **Journal of Food Protection,** v. 68, n. 10, p. 2068-2077, 2005.

ALVES, V. F. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, v.74, p.623-627, 2006.

ARAÚJO, P. C. C. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, p.19-25, 2002.

ATANASSOVA, V.; REICH, F.; KLEIN, G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. **Journal of Food Protection**, v.71, n.4, p.860-864, 2008.

BASTI, A. A. et al. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v.17, p.183-188, 2006.

BENABBOU, R et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a combination of chitosan and divergicin M35. **Canadian Journal of Microbiology,** v. 55, p. 347-355, 2009.

BENKERROUM, N. et al. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. Lactis as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.56-63, 2005.

BORGES, M. F. et al. Occurrence of *Listeria monocytoges* in salami. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.362-364, 1999.

BORTOLUSSI, R. Listeriosis: a primer. **Canadian Medical Association Journal**, v. 179, n. 8, p. 795-797, 2008.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides,* carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.349-356, 2007a.

BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.471-478, 2007b.

BREDHOLT, S.; NESBAKKEN, T.; HOLCK, A. Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gás packaged meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 43-52, 1999.

BREWER, R.; ADAMS, M. R.; PARK, S. F. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.18-21, 2002.

BRILLET, A. et al. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, p.309-324, 2005.

BROMBERG, R. et al. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. hordniae CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Aliment.**, v.26, p.135-144, 2006.

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

CABEDO, L. et al. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. **Journal of Food Protection**, v.71, n.4, p.855-859, 2008.

CAMPO, J. D.; AMIOT, M.; NGUYEN-THE, C. Antimicrobial effect of rosemary extracts. **Journal of Food Protection**, v.63, n.10, p.1359-1368, 2000.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, 2007.

CARRAMIÑANA, J. J. et al. Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. **Journal of Food Protection**, v. 71, n.3, p. 502-508, 2008.

CARVALHO, A. A. T. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. **Food Microbiology**, v.23, p.213-219, 2006.

CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.4, p.569-571, 2003.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.5, p.541-544, 2004.

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

CONTE, A. et al. Effect of lemon extract on foodborne microorganisms. **Journal of Food Protection**, v.70, n.8, p.1896-1900, 2007.

CORBO, M. R. et al. Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. International Journal of Food Microbiology, v.127, p.261-267, 2008.

COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, Supl., p.66-67, 2002.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

DAVIDSON, C. M.; CRONIN, F. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 439-440, 1973.

DE MARTINIS, E. C. P. et al. Antilisterial activity of lactic acid bactéria isolated from vacuumpackaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamental and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v.18, p.191-208, 2002.

DEEGAN, L. H. et al. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p.1058-1071, 2006.

DESTRO, M. T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.191-196, 2000.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

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

DREVETS, D. A.; BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.53, p.151-165, 2008.

DUFFES, F. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4ºC. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 33-42, 1999a.

DUFFES, F. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold smoked salmon. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 12, p. 1394-1403, 1999b.

ERCOLINI, D. et al. Mesophilic and psychrotrophic bactéria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1990-2001, 2009.

ETTAYEBI, K.; YAMANI, J. E.; ROSSI-HASSANI, B. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, p.191-195, 2000.

FARBER, J. M. FAO expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.171, 2000.

FERNANDES, L. P. **Desenvolvimento tecnológico de produtos particulados obtidos a partir de *Lippia sidoides* pela técnica de *spray drying* e avaliação das suas propriedades antifúngicas.** 2008. 134f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

FERNANDES, L. P. et al. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. **Drying Technology**, v.26, p.1534-1542, 2008.

FIROUZI, R. et al. Effects of essential oils of oregano and nutmeg on growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in barbecued chicken. **Journal of Food Protection**, v.70, n. 11, p. 2626-2630, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **The state of world fisheries and aquaculture 2006.** Rome, 2007. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/009/a0699e/A0699E00.HTM>. Acesso em: 10 out. 2008

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Regional review on aquaculture development 1. Latin America and the Caribbean – 2005.** Rome, 2006. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0651b/a0651b00.pdf/>. Acesso em: 10 out. 2008.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.934-940, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 182f.

GALVÉZ, A. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, 2007.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GÄNZLE, M.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 207-217, 1999.

GHALFI, H. et al. Effectiveness of cell-adsorbed bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and selected essential oils to control *Listeria monocytogenes* in pork meat during cold storage. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.268-273, 2007.

GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. N. et al. Foodborne pathogenic bactéria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3ºC. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p.135-141, 2002.

GRAM, L. Potential hazards in cold-smoked fish: *Listeria monocytogenes.* **Journal of Food Science**, Supplement, v.66, n.7, p.1072-1081, 2001.

GRANDE, M. J. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus.* **Journal of Food Protection**, v.70, n.2, p.405-411, 2007.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142-150, 2009.

HARPAZ, S. et al. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared Asian Sea Bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.410-417, 2003.

HÉQUET, A. et al. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.67-74, 2007.

HIMELBLOOM, B.; NILSSON, L.; GRAM, L. Factors affecting production of an antilisterial bacteriocin by *Carnobacterium piscicola* strain A9b in laboratory media and model fish systems. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.506-513, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Estatística da pesca 2006.** Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. Brasília, 2008. 181p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/>. Acesso em: 25 nov. 2008.

JOFFRAUD, J. J. et al. Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, p.51-61, 2006.

KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. *Listeria* in tropical fish and fishery products. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, p.177-181, 2000.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT – Food Science and Techonology**, v. 41, p. 119-127, 2007.

KONINGS, W. N. et al. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. Current **Opinion in Microbiology**, v.3, p.276-282, 2000.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina.** 2006. 91f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, Área de Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LEISNER, J. J. et al. *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. **FEMS Microbiology Rev.,** v.31, p.592-613, 2007.

LIANOU, A.; SOFOS, J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.

MACIEL, V. ***Listeria monocytogenes* em amostras cérvico-vaginais de pacientes, amostras de alimentos e refrigeradores domésticos na região de Ribeirão Preto, Brasil: ocorrência, caracterização de marcadores fenotípicos virulência e determinação da resistência a antibióticos.** 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Área de Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

MARTINEZ, R. C. R.; DE MARTINIS, E. C. P. Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2a growth and haemolytic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.83-87, 2005.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. **Methods in Microbiology**, v. 7, p. 313-342, 1972.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

MISAGHI, A.; BASTI, A. A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. **Food Control**, v.18, p.1043-1049, 2007.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.11, p.378-382, 2007.

MORA, D.; SCARPELLINI, M.; FRANZETTI, L.; COLOMBO, S.; GALLI, A. Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342(T) and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730(T) and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 675-678, 2003.

NASAR-ABBAS, S. M.; KADIR HALKMAN, A. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria L*.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.63-69, 2004.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 108-113, 2007.

NILSSON, L.; GRAM, L.; HUSS, H. H. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 4, p. 336-342, 1999.

NILSSON, L. et al. Role of acetate in production of na autoinducible class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2251-2260, 2002.

NILSSON, L. et al. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 133-143, 2004.

NILSSON, L. et al. Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 172-183, 2005.

NUNES, R. S. et al. Padronização da matéria-prima vegetal e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae)

frente a *Streptococcus mutans*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.86, n.2, p.80-83, 2005.

OLASUPO, N. A. et al. Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 3, p. 596-600, 2004.

OLIVEIRA, W. P.; BOTT, R. B.; SOUZA, C. R. F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. **Drying Technology**, v.24, n.4, p.523-533, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D.(Editores). **Aqüicultura no Brasil: o desafio é crescer.** Brasília, 2008. 276p.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p.414-420, 2007.

OWEN, R. J.; PALOMBO, E. A. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. **Food Control**, v.18, p.387-390, 2007.

PAO, S. et al. Microbial quality of raw aquacultured fish fillets procured from internet and local retail markets. **Journal of Food Protection**, v.71, n.8, p.1544-1549, 2008.

PASTORE, G. M. O crescimento da indústria de carnes a partir de produtos com valor agregado. **Jornal da Unicamp**, Campinas, 27 de março a 2 de abril de 2006. Artigo, p.2.

PERIAGO, M. P.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology,** v.68, p.141-148, 2001.

POL, I. E.; SMID, E. J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.166-170, 1999.

PRADO, C. S. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.4, 2000.

RAJKOVIC, A. et al. Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. **Food Microbiology,** v.22, p.189-197, 2005.

RATTI, R. P. ***Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle.** 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia, Área Biociências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 197-209, 2000.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.3-16, 2002.

SAKATE, R. I. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v.53, n.2, 2003.

SANDRI, I. G. et al. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry**, v.103, p.823-828, 2007.

SCHELCH, W. F. III et al. Does esporadic *Listeria* gastroenteritis exist? A 2-year population-based survey. **Clinical Infections Diseases,** v. 41, p. 778-784, 2005.

SCHIMER, B. C.; HEIR, E.; LANGSRUD, S. Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 2106-2112, 2009.

SCHÖBITZ, R. P. et al. Bacteriocin like substance production by *Carnobacterium piscicola* in a continuous system with three culture broths. Study of antagonism against *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged salmon. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.52-57, 2006.

SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. The action of thymol on oral bacteria. **Oral Microbiology Imunology**, v. 10, n. 4, p. 241-246, 1995.

SILVA, W. P. et al. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.3, p.911-916, 2004.

SIVAROOBAN, T.; HETTIARACHCHY, N. S.; JOHNSON, M. G. Inhibition of *Listeria monocytogenes* using nisin with grape seed extract on turkey frankfurters stored at 4 and 10ºC. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 4, p. 1017-1020, 2007.

SOUZA, E. L.; SILVA, C.A.; SOUSA, C. P. Bacteriocins: Molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.559-566, 2005.

TEDESCHI, P. et al. Fungitoxicity of lyophilized and spray-dried extracts. **Journal of Environmental Science and Heath Part B**, v.42, p.795-799, 2007.

TOMÉ, E.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. A. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. **Food Microbiology**, v.23, p.399-405, 2006.

TOMÉ, E.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. C. Growth controlo of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bactéria. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.285-294, 2008.

TULINI, F. L. **Purificação e caracterização parcial da bacteriocina produzida por *Carnobacterium piscicola* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]).** 2008. 75f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

TULINI, F. L.; REIS, F. B.; DE MARTINIS, E. C. P. Caracterização preliminar da produção e estabilidade da bacteriocina produzida por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]). In: 8º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2009, Campinas. **Resumos...** Campinas: UNICAMP, 2009.

TULINI, F. L.; DE MARTINIS, E. C. P. Improved adsorption-desorption extraction applied to the partial characterization of the antilisterial bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum*. **Brazilian Journal of Microbiology.** [no prelo]

UYTTENDAELE, M. et al. Prevalence and challeng tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 94-104, 2009.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VELDHUIZEN, E. J. A. et al. Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2127-2132, 2007.

VERMEIREN, L. et al. The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. **Food Microbiology**, v. 23, p. 511-518, 2006.

VESCOVO, M.; SCOLARI, G.; ZACCONI, C. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. **Food Microbiology**, v. 23, p. 689-693, 2006.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174-179, 2008.

YAMAZAKI, K. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. **Journal of Food Protection**, v.66, n.8, p.1420-1425, 2003.

ZHOU, F. et al. Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Protection**, v.70, n.7, p.1704-1709, 2007.

ANEXO

ANEXO

Preparação do extrato hidroalcoólico e óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

As soluções extrativas de *L. sidoides* foram preparadas a partir das folhas secas e moídas por maceração dinâmica, utilizando um sistema constituído de recipiente encamisado e agitação mecânica. Os extratos brutos obtidos foram filtrados através de filtração a vácuo, sendo então, concentrados até 12,5% de teor de sólidos, em rotaevaporador à pressão de vácuo de 500 N/m^2 e temperatura de 40ºC (FERNANDES, 2008).

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas frescas trituradas de *L. sidoides* através do método de extração por arraste por vapor d'água, usando o aparelho de Clevenger modificado (FERNANDES, 2008).

Os extratos secos E1 e E2 foram obtidos a partir da solução extrativa, a qual foi adicionada às soluções dos adjuvantes. Como adjuvantes foram utilizadas diferentes proporções de maltodextrina DE 10 e goma arábica, o extrato seco E1 apresentou em sua composição maltodextrina e goma arábica na proporção 2:3 (m/m), enquanto o extrato seco E2, a proporção foi de 0:1 (m/m). Os extratos secos apresentaram um teor de sólidos de 20% (m/m) para os líquidos de alimentação. A secagem dos líquidos de alimentação foi realizada em um *spray dryer* (LAB PLANT mod. SD 05) em regime co-corrente (FERNANDES, 2008).

Para a obtenção de micropartículas do óleo essencial de *L. sidoides*, o óleo essencial foi adicionado à solução de carreadores e foi utilizado 50% de teor de sólidos (m/m) e proporção carreador:óleo essencial (4:1) (m/m). Como carreadores

foram empregadas misturas de maltodextrina DE 10 e goma arábica em diferentes proporções, as micropartículas O1 apresentaram em sua composição maltodextrina e goma arábica na proporção 2:3 (m/m), enquanto as micropartículas O2, a proporção foi de 0:1 (m/m). A secagem dos líquidos de alimentação foi realizada em *spray dryer* (LAB PLANT mod. SD 05) em regime co-corrente (FERNANDES, 2008).

Considerando que o extrato hidroalcoólico apresentava 12,5% de teor de sólidos (m/m) e 0,89 mg/mL de densidade, foi calculada a concentração do extrato no caldo BHI em μg/mL. O óleo essencial apresentava 0,934 mg/mL, e foi calculada a concentração do óleo em μg/mL. Os extratos secos (E1 e E2) apresentavam 20% de teor de sólidos (m/m), sendo calculada a concentração dos extratos secos em μg/mL em relação ao teor de sólidos da solução extrativa, descontando-se a quantidade de adjuvantes adicionados ao líquido de alimentação a ser seco. Para as micropartículas de óleo essencial, a concentração de O1 e O2 em μg/mL foi calculada considerando a proporção 4:1 de carreadores:óleo essencial, sendo calculada através da relação da quantidade de óleo essencial encapsulado, correspondendo a 13,5% e 16% para as amostras O1 e O2, respectivamente.