UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos

Vanessa Bíscola

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Tit. Bernadette Dora G. de Melo Franco

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Biscola, Vanessa
B621i Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo
essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*:
avaliação em modelos cárneos / Vanessa Biscola. -- São Paulo,
2007.
74p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.
Orientado por: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

1. Bromatologia 2. Microbiologia de alimentos I. T. II.
Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.

641 CDD

Vanessa Bíscola

Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientadora/Presidente

Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk
1º. examinador

Prof. Dr. Ary Fernandes Junior
2º. examinador

São Paulo, 31 de julho de 2007.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Vanessa Biscola no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 31 dias do mês de julho de 2007, no(a) Aud. Vermelho - FCF/ USP realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Vanessa Biscola, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

"Influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: avaliação em modelos cárneos"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco	Presidente	FCF - USP	Aprovada Aprovada Aprovada
Cynthia Jurkiewicz Kunigk	Titular	Externo	
Ary Fernandes Junior	Titular	Externo	
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

APROVADA POR UNANIMIDADE.

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Edison Feltosa dos Santos, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as), São Paulo, aos 31 dias do mês de julho de 2007.

Cynthia Jurkiewicz Kunigk

Ary Fernandes Junior

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 31/07/2007

A Deus, pelo dom da vida e presença constante.

Aos meus pais, Fátima Regina e Antonio, pela doação completa, amor incondicional, apoio, carinho, compreensão e principalmente por terem sempre se empenhado em me ensinar a ser melhor.

À minha irmã, Cíntia, por ser parte da minha vida e estar sempre ao meu lado.

Ao grande amigo, Adriano Andreghetto, por ter cruzado meu caminho tornando-o melhor.

À Maria Antônia, por ter plantado a semente do conhecimento e tê-la cultivado com empenho e carinho.

À Profa. Titular Bernadette Dora Gombossy de Melo
Franco, a quem passei a admirar não apenas pelo grande
conhecimento e competência profissional, mas também
pela sincera grandeza de caráter.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Bernadette D.G.M. Franco, pela amizade, orientação, paciência, apoio e oportunidade de aprendizado.

Às Profa. Dra. Mariza Landgraf e Profa. Dra. Maria Teresa Destro pelo apoio e convívio.

Ao Prof. Dr. Ary Fernandes Junior, pelo apoio e sugestões feitas no exame de qualificação.

À Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk, pelo apoio e sugestões feitas no exame de qualificação.

Às irmãs que a vida colocou no meu caminho Ana Eucares e Tatiana, por terem feito tudo ser melhor.

Às amigas Kátia Leani e Cecília, pela ajuda e por todos os momentos de alegria, companheirismo e troca que compartilhamos.

À Ângela P. Azevedo, pela amizade e por toda ajuda prestada na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos: Alcina, Cíntia, Cristina, Cristiano, Danielle, Denise, Eb, Flávia, Gabriela, Graciela, Hans, Janine, Kátia Lima, Keila, Lina, Marildes, Monika, Matheus, Paulo, Susana, Verônica e Vinicius, pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

A auxiliar de laboratório Lucia, pelo convívio agradável e por sempre estar disposta a ajudar.

À Mônica, Cleonice e Edilson da secretaria do departamento, pelos serviços prestados.

À Elaine e Jorge da secretaria de Pós-Graduação, pela atenção dedicada e serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos.

À empresa Kienast & Kratschmer Ltda., pela doação dos ingredientes utilizados na fabricação dos modelos cárneos (antioxidante - Fixador A80S, emulsificante - Krakoline E, sais de cura - Pó Húngaro III e condimentos - Condimento para Lingüiça 102).

À empresa Duas Rodas Industrial Ltda., pela doação do óleo essencial de orégano utilizado neste trabalho.

À empresa Danisco pela doação da nisina utilizada neste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela irradiação da carne e de todos os ingredientes utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho de pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	Ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.2 Antimicrobianos Naturais.....	6
2.2.1 Bacteriocinas.....	8
2.2.1.1 Bacteriocinas da Classe I.....	12
2.2.1.1.1 Nisina.....	13
2.2.2 Óleos Essenciais.....	17
2.2.2.1 Óleo Essencial de Orégano (O.E.O.).....	20
2.3 Interações entre os Antimicrobianos Naturais e os Constituintes da Matriz Alimentar.....	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Material.....	29
4.1.1 Modelos cárneos.....	29
4.1.2 Antimicrobianos naturais.....	30

4.1.3 Cultura microbiana.....	30
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Preparo da cultura de <i>L. monocytogenes</i>	31
4.2.2 Preparo dos modelos cárneos.....	31
4.2.3 Avaliação da interferência dos ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial da nisina e óleo essencial de orégano.....	32
4.2.3.1 Contaminação experimental com <i>L.monocytogenes</i>	32
4.2.3.2 Enumeração de <i>L. monocytogenes</i>	32
4.2.3.3 Repetições e análise estatística.....	33
4.2.4 Avaliação da interferência do tempo de contato da nisina e do óleo essencial de orégano com os ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial.....	33
4.2.4.1 Contaminação experimental com <i>L.monocytogenes</i>	33
4.2.4.2 Enumeração de <i>L. monocytogenes</i>	34
4.2.4.3 Repetições e análise estatística.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Efeito da interferência dos ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial da nisina e óleo essencial de orégano.....	36
5.2 Avaliação da interferência do tempo de contato da nisina e do óleo essencial de orégano com os ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial.....	45
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química da nisina Z.....	15
Figura 2.	Estrutura química de carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno.....	21
Figura 3.	Fluxograma do teste de avaliação da interferência dos ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial de nisina e óleo essencial de orégano.....	35
Figura 4.	Fluxograma do teste de avaliação da interferência do tempo de contato da nisina e do óleo essencial de orégano com os ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial.....	36
Figura 5.	Representação gráfica das diferenças nas contagens de <i>L. monocytogenes</i> obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, antes do início do período de armazenamento.....	39
Figura 6.	Representação gráfica das diferenças nas contagens de <i>L. monocytogenes</i> obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, após 24h de armazenamento sob refrigeração (5°C).....	39
Figura 7.	Representação gráfica das diferenças nas contagens de <i>L. monocytogenes</i> obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, após 48h de armazenamento sob refrigeração (5°C).....	40
Figura 8.	Representação gráfica das diferenças nas contagens de <i>L. monocytogenes</i> obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, após 72h de armazenamento sob refrigeração (5°C).....	40

- Figura 9. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, durante todo o período de armazenamento sob refrigeração (5°C)..... 41
- Figura 10. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação A adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 47
- Figura 11. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação B adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 49
- Figura 12. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação C adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 51
- Figura 13. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação D adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 53
- Figura 14. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação E adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 56

- Figura 15. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação F adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 58
- Figura 16. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação G adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 60
- Figura 17. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação H adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Procedimentos tradicionais e emergentes utilizados no controle microbiano nos alimentos, adaptado de Gold (1996).....	7
Tabela 2.	Sistemas antimicrobianos naturais, adaptado de Gold (1996).....	7
Tabela 3.	Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos, adaptado de Cleveland <i>et al.</i> (2001).....	9
Tabela 4.	Classificação das bacteriocinas, adaptado de Cleveland <i>et al.</i> (2001).....	10
Tabela 5.	Classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, sugerida por Cotter <i>et al.</i> (2003).....	10
Tabela 6.	Exemplos de lantibióticos, adaptado de McAuliffe <i>et al.</i> (2001).....	13
Tabela 7.	Principais componentes presentes em O.E. que apresentam potencial antimicrobiano, adaptado de Burt (2004).....	19
Tabela 8.	Estudos que relataram a atividade antimicrobiana de carvacrol e timol, adaptado de Dorman & Deans (2000).....	23
Tabela 9.	Proporção de componentes fenólicos em óleo essencial de orégano, adaptado de Burt (2004).....	24
Tabela 10.	Efeito inibitório de O.E.O. contra diversos microrganismos, adaptado de Burt (2004).....	25
Tabela 11.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC.g ⁻¹) nos oito modelos cárneos, com e sem antimicrobianos, após armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	38
Tabela 12.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação A*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	46
Tabela 13.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação B*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	48

Tabela 14.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação C*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	50
Tabela 15.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação D*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	52
Tabela 16.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação E*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	55
Tabela 17.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação F*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por 24h, 48h e 72h.....	57
Tabela 18.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação G*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	59
Tabela 19.	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> no modelo cárneo correspondente à formulação H*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de <i>L.monocytogenes</i> 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.....	61

RESUMO

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico psicrotrófico e consequentemente de grande importância para alimentos conservados em refrigeração. Vários estudos têm demonstrado que é possível utilizar antimicrobianos naturais, como bacteriocinas e compostos fenólicos, para retardar a multiplicação desse patógeno em produtos cárneos refrigerados. Entretanto, sabe-se que a atividade antimicrobiana desses compostos pode ser influenciada pelos componentes da matriz alimentar. Esse trabalho de mestrado pretendeu avaliar a influência dos ingredientes de lingüiça fresca de suíno na ação inibitória de óleo essencial de orégano (OEO) e nisina sobre *Listeria monocytogenes*. Foram realizados testes com diferentes modelos alimentares preparados com carne suína moída adicionada de cada um dos ingredientes utilizados na fabricação de lingüiça fresca (sais de cura, açúcar, antioxidante, emulsificante, condimentos e NaCl) separadamente, comparando-se os resultados com os obtidos no modelo contendo todos os ingredientes simultaneamente. Pretendeu-se também avaliar a interferência do tempo de contato da nisina e óleo essencial de orégano com os diferentes modelos alimentares na ação antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*. Os resultados indicaram que os antimicrobianos foram capazes de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em todos os modelos analisados armazenados à 5°C por até 72h. Comparando-se todos os modelos compostos por carne adicionada de apenas um dos ingredientes, a maior atividade antilisterial foi observada no modelo composto de carne com antioxidante. Entretanto, essa atividade inibitória foi menor do que a obtida no modelo contendo todos os ingredientes em conjunto. Quanto à influência do tempo prévio de contato entre os antimicrobianos e os modelos estudados na ação antilisterial, observou-se que na formulação com todos os ingredientes a ação foi mais intensa quando o contato foi de 2h. Entretanto, neste modelo o efeito mais duradouro foi obtido com 12h de contato prévio. Nos demais modelos, o maior efeito foi obtido no tempo zero. Os resultados permitem concluir que cada um dos ingredientes da formulação da lingüiça contribui com uma parcela na ação antilisterial do OEO e nisina nesse produto, e que essa ação é influenciada pelo tempo de contato prévio entre os modelos e os agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: Lingüiça. Nisina. Óleo essencial de orégano. Ingredientes de lingüiça. *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Influence of the food matrix on the antimicrobial effect of oregano essential oil and nisin against *Listeria monocytogenes*: evaluation in meat models

Listeria monocytogenes is psychrotrophic pathogen and, consequently, very important for cold-preserved foods. Many studies have demonstrated that natural antimicrobials such as bacteriocins and phenolic compounds can be used to inhibit the growth of this pathogen in refrigerated meat products. However, it is known that the antimicrobial activity of these antimicrobials may be influenced by components of the food matrix. The aim of the present study was to evaluate the influence of the ingredients of “linguiça” in the inhibitory activity of O.E.O. and nisin against *L. monocytogenes*. The study was carried out with different food models prepared with minced raw pork meat added separately of each ingredient used for manufacturing “linguiça” (curing salts, sugar, antioxidants, emulsifiers, condiments and NaCl), and results were compared to those obtained in a model containing all ingredients simultaneously. The study also aimed to evaluate the interference of the contact time between the food models and the antimicrobials on the effect against *L. monocytogenes*. Results indicated that the antimicrobials added to the models were able to inhibit the growth of the pathogen at 5°C up to 72h. Comparing the models, the highest antilisterial activity was observed in the model containing pork meat and antioxidants. However, this inhibitory activity was lower than that observed in the model with all ingredients. What concerns the influence of contact time in antilisterial activity, we observed that in the model containing all ingredients the antilisterial activity was more intense after 2h of contact, but the more lasting effect was observed after 12h of contact. In the other models, the most intense effect was noted in time zero. The conclusions of the study are that each ingredient used in manufacture of “linguiça” has its share in the antilisterial activity of nisin and OEO in this product and that this activity is influenced by the contact time between the food matrix and the antimicrobials.

Key-words: Sausage. Nisin. Oreganum essential oil. Sausage ingredients. *Listeria monocytogenes*.

1. INTRODUÇÃO

Apesar das diferentes técnicas empregadas para impedir que microrganismos patogênicos cheguem até os alimentos comprometendo sua qualidade e segurança, as enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) continuam preocupando os agentes de saúde pública (Jay, 2005). Diversos microrganismos podem ser veiculados por alimentos causando doenças nos seres humanos, um exemplo é *Listeria monocytogenes* que possui destaque devido à sua patogenicidade, elevada resistência fisiológica e capacidade de sobrevivência e multiplicação em atmosferas modificadas e temperaturas de refrigeração tornando difícil controlar sua presença nos alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico (Bersot *et al.*, 2001; Lukinmaa *et al.*, 2004; Rocourt, 1999; Ryser, 1999; Samelis *et al.*, 2005).

A carne e seus derivados incluem-se entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública, em razão dos riscos que oferecem pela contaminação com uma grande variedade de bactérias patogênicas. As linguiças mistas e suínas apresentam-se como excelentes substratos para o desenvolvimento de microrganismos, devido a uma série de fatores favoráveis, como pH pouco ácido, alta atividade de água, mistura de diferentes tipos de ingredientes e intenso manuseio durante seu processamento, aumentando a probabilidade de contaminação com microrganismos indesejáveis (Liserre *et al.*, 2002; Martinis & Franco, 1998; Samelis *et al.*, 2005). Silva *et al.* (2004) encontraram uma elevada frequência de *L. monocytogenes* em amostras de linguiça fresca refrigerada.

A utilização de conservantes químicos é uma alternativa bastante utilizada no controle da multiplicação microbiana nos alimentos. Porém, esta utilização compromete a aceitação por parte dos consumidores que vêm exigindo alimentos livres de conservantes sintéticos. Aliado a esse fator temos também os prejuízos à saúde relacionados com alguns conservantes químicos, um bom exemplo é a possível formação de compostos carcinogênicos derivados da aplicação de nitrito em produtos cárneos. (Pranoto *et al.*, 2005; Rodgers, 2001).

A nisina é um exemplo de agente conservante natural com efeito inibitório sobre vários tipos de bactérias (Deegan *et al.*, 2006). É uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que age sobre bactérias Gram-positivas através da permeabilização da membrana citoplasmática provocando a formação de poros na membrana e efluxo de importantes constituintes intracelulares levando a um colapso da força próton motriz e à lise da célula

vegetativa (Guinane *et al.*, 2005; Pol & Smid, 1999). McAuliffe *et al.* (2001) observaram sua atividade antimicrobiana sobre diversos microrganismos incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium* e *Bacillus*.

A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê de aditivos de alimentos do Codex Alimentarius, da FAO, como GRAS (*Generally Recognised as Safe*) e tem uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano em cerca de 50 países (Martinis *et al.*, 2001).

O emprego de nisina como conservante em alimentos tem algumas limitações. Segundo Riley & Wertz (2002), múltiplas exposições de um patógeno à nisina aumentam a probabilidade de seleção de mutantes resistentes estáveis recomendando-se sua utilização em conjunto com outros obstáculos comumente utilizados na conservação de alimentos como uma alternativa para minimizar este problema.

Alguns estudos demonstraram que os efeitos da nisina podem ser potencializados pela sua associação com outros antimicrobianos naturais em baixas concentrações (Burt, 2004; Ettayebi *et al.*, 2000; Periago & Moezelaar, 2001; Yamazaki *et al.*, 2004).

Ervas e condimentos, adicionados aos alimentos com o objetivo de melhorar suas características sensoriais, contém compostos com ação bactericida e/ou bacteriostática (Baydar *et al.*, 2004; Demo *et al.*, 2005; Dorman *et al.*, 2003; Mourey & Canillac, 2002). Os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana das ervas e condimentos são compostos fenólicos como o timol e o carvacrol, que têm característica hidrofóbica, com atuação em diversos sítios da célula microbiana como a parede celular e a membrana citoplasmática, levando à perda de constituintes celulares, ruptura da estrutura da membrana e morte celular (Burt, 2004).

Estudos realizados por Kruger (2006) avaliaram o efeito inibitório de diferentes concentrações de nisina e óleo essencial de orégano (O.E.O.), empregados separadamente e em conjunto, no controle de *Listeria monocytogenes*. Foram realizados testes *in vitro* e em modelo alimentar (lingüiça frescal). As maiores inibições na multiplicação do patógeno foram obtidas utilizando-se os antimicrobianos em conjunto nas concentrações de 200 ppm de nisina e 0,5% de O.E.O. Entretanto, nesses estudos foi verificado que a ação inibitória desses compostos ocorre imediatamente após o contato com os microrganismos na lingüiça, e diminui consideravelmente em seguida, não se mantendo ao longo do armazenamento do produto. Após a redução da contagem de *L. monocytogenes* decorrente desse primeiro contato na lingüiça contendo os antimicrobianos, as células sobreviventes apresentam a mesma velocidade de multiplicação de *L. monocytogenes* em

lingüiça sem os antimicrobianos. Esses resultados sugerem uma forte interferência da matriz alimentar na atividade antimicrobiana da nisina e de óleo essencial de orégano, comprovando resultados apresentados por outros pesquisadores (Aasen *et al.*, 2003; Deegan *et al.*, 2005).

Em face ao apresentado, este trabalho de mestrado pretendeu avaliar a interferência dos ingredientes comumente empregados na fabricação de lingüiça frescal no potencial antimicrobiano de nisina e óleo essencial de orégano, utilizados em conjunto, contra *Listeria monocytogenes*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico amplamente distribuído na natureza, podendo ser isolado de diversas fontes incluindo solo, silagem, planta processadora de alimentos, carnes cruas e fezes de animais e humanos. Os alimentos aparecem como o principal veículo deste patógeno para humanos. Uma importante característica que contribui para este fato é sua capacidade de sobrevivência e multiplicação mesmo a temperaturas de refrigeração (Franco & Landgraf, 2005; ICMSF, 1996).

A multiplicação desse microrganismo é estimulada por Fe^{3+} e fenilalanina, tendo como requerimentos primários para seu desenvolvimento a glicose (fonte de carbono) e a glutamina (fonte de nitrogênio). A utilização de glicose em condições aeróbias resulta na produção de lactato, acetato e acetoína. Por serem microaeróbias ou anaeróbias facultativas, essas bactérias também podem se desenvolver em atmosferas modificadas (Rocourt, 1999).

L. monocytogenes é um patógeno oportunista que apresenta maior risco para indivíduos com algum comprometimento do sistema imunológico, como transplantados, portadores de HIV, indivíduos com câncer, idosos ou recém nascidos. Nesses casos a taxa de mortalidade pode chegar a 40% (Altekruze *et al.*, 1997; Franco & Landgraf, 2005; ICMSF, 1996). Mulheres grávidas também sofrem uma alteração no estado imunológico, facilitando a infecção, podendo haver a invasão do feto e, dependendo do estágio em que a gravidez se encontra, ocorrer aborto, parto prematuro, nascimento de natimorto ou septicemia neonatal. A ocorrência de bacteremia por *L. monocytogenes* em adultos não é rara, o sintoma mais comum é febre, mas esses pacientes queixam-se também de fadiga, mal-estar podendo haver ou não presença de náusea, vômito, dores e diarreia (Franco & Landgraf, 2005; ICMSF, 1996).

Segundo Benkerroum *et al.* (2005), *L. monocytogenes* continua comprometendo a segurança dos alimentos, principalmente de alimentos prontos para o consumo. Este microrganismo é freqüentemente encontrado em carnes e produtos cárneos e embora se apresente, geralmente, em baixas contagens em carnes frescas, à medida que aumenta o seu grau de processamento, o risco de contaminação também é aumentado (Castellano *et al.*, 2004; Jay, 1996). *L. monocytogenes* apresenta alta resistência a ambientes desfavoráveis, fato que constitui um problema para sua eliminação na indústria alimentícia sendo comum a presença do patógeno

no ambiente fabril (Castellano *et al.*, 2004). Em plantas processadoras de produtos cárneos *L. monocytogenes* pode estar presente em diversos locais, incluindo as salas de corte, e eventualmente contaminar os produtos após o tratamento térmico como a pasteurização (Abee, *et al.*, 1995). Além disso, *L. monocytogenes* possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua contaminação em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento (Rórvik *et al.*, 2003).

Jay (1996), pesquisando a prevalência de *Listeria* spp. em amostras de carnes e aves de diversos países, encontrou uma prevalência global de aproximadamente 20% para este microrganismo em carne de porco, 16% em carne bovina e 17% em carne de aves. Mead *et al.* (2006) relataram a ocorrência de um surto envolvendo *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos processados que atingiu 108 pessoas nos EUA, resultando em 14 mortes. Bohaychuk *et al.* (2006) avaliaram a prevalência de *E. coli* produtora de toxina de Shiga, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Campylobacter* spp. em amostras de produtos crus e prontos para o consumo, à base de carne e carne de frango, coletadas no mercado de Edmonton, Canadá. Uma amostra de carne moída continha *E. coli* O22:H8, produtora de toxina de Shiga, e que *Salmonella* e *Campylobacter* foram encontrados em 30% e 62% das amostras de coxas de frango cruas, respectivamente. *Listeria monocytogenes* foi encontrada em 52% das amostras de carne moída crua, 34% das amostras de coxas de frango cruas, 24% das amostras de carne de porco crua, 4% das amostras de lingüiças fermentadas e 3% das amostras de peito de peru.

Estudos realizados no Brasil demonstram que a presença de *L. monocytogenes* em alimentos cárneos também é freqüente. Destro *et al.* (1991) pesquisaram a incidência deste patógeno em carne, lingüiça, salsicha, leite *in natura* e queijo tipo “minas frescal”, encontrando uma incidência média de 32%, sendo que as amostras de lingüiça foram as que apresentaram maior incidência do microrganismo (80%) seguidas pelas amostras de salsicha (70%), carne (65%) e queijo tipo “minas frescal” (10%). *L. monocytogenes* não foi encontrada em nenhuma das amostras de leite *in natura*. Bersot *et al.* (2001) pesquisaram a incidência de *L. monocytogenes* em 30 amostras de mortadela comercializadas na cidade de São Paulo, verificando que o patógeno estava presente em 26,7% das amostras analisadas. Silva *et al.* (2004), pesquisaram a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em 41 amostras de lingüiça mista do tipo frescal de três frigoríficos de Pelotas-RS e verificaram que 100% das amostras foram positivas para *Listeria* spp. e 29,3% para *L. monocytogenes*.

2.2 Antimicrobianos Naturais

As mudanças nos hábitos alimentares dos consumidores e sua exigência por novos produtos aliados à segurança têm afetado a indústria processadora de alimentos. Além disso, os consumidores passaram a exigir produtos minimamente processados, com maior qualidade, conveniência, longa vida útil e sem conservadores sintéticos (Brul & Coote, 1999; Devlieghere, *et al.*, 2004; Pranoto, *et al.*, 2005; Rydlo, *et al.*, 2006). Outro fator a ser observado é que a população está envelhecendo e uma população mais idosa é também mais susceptível aos patógenos alimentares (Zink, 1997). Tudo isso faz a indústria de alimentos buscar novos métodos de processamento e conservação dos alimentos para substituir os métodos tradicionais de uso de altas temperaturas, acidificação, congelamento, desidratação e adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos as tecnologias mais estudadas para a inativação de microrganismos incluem os processos não térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (Devlieghere *et al.*, 2004). A Tabela 1 resume os principais métodos existentes para o controle microbiano nos alimentos.

Segundo Rodgers (2001), a utilização de agentes químicos na conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos “frescos” ou naturais. Uma alternativa seria a utilização de agentes antimicrobianos naturais. Vários são os exemplos de agentes antimicrobianos presentes em animais, plantas e microrganismos (Devlieghere *et al.*, 2004). Esses agentes têm suas propriedades relacionadas a modificações na membrana dos microrganismos provocando o aparecimento de poros. A Tabela 2 apresenta alguns exemplos destes sistemas antimicrobianos.

Todos esses compostos apresentaram um substancial potencial antimicrobiano em estudos realizados *in vitro*. Porém, para sua aplicação como agentes conservadores em alimentos, dois aspectos de extrema importância devem ser considerados: mudanças nas características sensoriais do produto onde serão adicionados e interações entre os compostos antimicrobianos e os ingredientes presentes nas matrizes alimentares, pois frequentemente essas interações afetam o potencial antimicrobiano dos compostos resultando em efeitos moderados ou até insignificantes na conservação dos alimentos (Devlieghere *et al.*, 2004).

Tabela 1. Procedimentos tradicionais e emergentes utilizados no controle microbiano nos alimentos, adaptado de Gold (1996).

Objetivo	Princípio	Procedimento
Redução ou inibição da multiplicação de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes	Baixa temperatura	Armazenamento sob refrigeração ou congelamento
	Baixa atividade de água	Secagem; cura; adição de conservantes (sal, açúcar)
	Restrição dos nutrientes disponíveis	Compartimentalização em emulsões água-óleo
	Diminuição do oxigênio disponível	Embalagens a vácuo ou com nitrogênio
	Aumento do dióxido de carbono	Embalagens com atmosfera modificada
	Acidificação	Adição de ácidos; fermentação
	Fermentação alcoólica	Fabricação de cervejas; vinificação e fortificação
Inativação dos microrganismos	Uso de conservadores	Adição de conservadores: inorgânicos (sulfito, nitrito); orgânicos (benzoato, sorbato, propionato); antibióticos (natamicina) e bacteriocinas (nisina, pediocina)
	Aquecimento	Pasteurização e esterilização
	Irradiação	Radiação ionizante
	Pressurização	Aplicação de alta pressão hidrostática
	Eletroporação	Aplicação de descargas elétricas de alta voltagem
	Termossonificação	Aquecimento através de ultra-som com pequeno aumento de pressão
	Lise bacteriana	Enzimas bacteriolíticas (lisozima)

Tabela 2. Sistemas antimicrobianos naturais, adaptado de Gold (1996).

Origem	Exemplos
Animal	Leite: lactoperoxidase; lactoferrina; lactoglobulinas Ovo: lisozima; ovotransferrina; ovoglobulina; avidina
Plantas	Crucíferas: saponinas; flavonóides; tiosulfatos; catequinas e glucosinolatos Ervas e condimentos: compostos fenólicos (eugenol, carvacrol, timol)
Microrganismos	Bactérias lácticas: bacteriocinas (nisina, pediocina, sakacina, etc.)
Ácidos	Lático; sórbico; acético e cítrico

O uso combinado de diferentes tratamentos considerados subletais pode, através de seus efeitos sinérgicos, promover a proteção dos alimentos e consumidores contra a ação de microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos (Brul & Coote, 1999). Esta também pode ser uma alternativa para a substituição de tratamentos severos e utilização de conservantes químicos que podem causar danos à saúde humana como, por exemplo, a adição de nitritos aos produtos cárneos que podem ocasionar a produção de compostos carcinogênicos como as nitrosaminas (Abee *et al.*, 1995). Além disso, a legislação tem restringido a utilização de conservantes químicos, o que vem trazendo problemas para as indústrias (Brul & Coote, 1999). Agentes antimicrobianos naturais como ácidos orgânicos, bacteriocinas e extratos de ervas aromáticas têm sido testados por seu potencial no controle da contaminação microbiana de carnes (Pranoto, *et al.*, 2005).

2.2.1 Bacteriocinas

As bacteriocinas são compostos com ação antimicrobiana que possuem um potencial de utilização na conservação de alimentos (Cleveland *et al.*, 2001; Millette *et al.*, 2006). Bacteriocinas são um grupo heterogêneo de peptídeos ou proteínas, sintetizadas ribossomicamente, que apresentam ação contra diversos microrganismos patogênicos como *L. monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Abee *et al.*, 1995; Caplice & Fitzgerald, 1999; Cleveland *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2005; Devlieghere *et al.*, 2004; Guerra & Pestana, 2003). As diferentes bacteriocinas apresentam variações no espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (Deegan *et al.*, 2005; Diep & Nes, 2002). As bacteriocinas foram primeiramente caracterizadas em bactérias Gram-negativas, como a colicinas, produzidas por *Escherichia coli*. Entretanto, as bacteriocinas que apresentam interesse na utilização em alimentos são aquelas produzidas por bactérias lácticas (Cleveland *et al.*, 2001; Papagianni, 2003).

Segundo Cleveland *et al.* (2001), as bacteriocinas diferem dos antibióticos principalmente quanto à síntese, ao espectro e modo de ação, à toxicidade e aos mecanismos de resistência (Deegan *et al.*, 2005). Essas diferenças estão melhor apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos, adaptado de Cleveland *et al.* (2001).

Característica	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicação	Alimentos	Clínica
Síntese	Ribossômica	Metabólitos secundários
Atividade	Pequeno espectro	Espectro variável
Auto-imunidade	Sim	Não
Mecanismo de resistência	Normalmente adaptação afetando composição da membrana celular	Normalmente um determinante geneticamente transferível afeta diferentes sítios
Modo de ação	Formação de poros	Alvos específicos
Toxicidade / Efeitos colaterais	Não conhecidos	Sim

Quanto à classificação, Klaenhammer (1993) dividiu as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas em quatro classes distintas, sendo que as mais estudadas são as pertencentes às classes I e II (Deegan *et al.*, 2005; Ennahar *et al.*, 2000). Essas classes incluem: (I) Lantibióticos; (II) pequenos peptídeos termoestáveis; (III) grandes proteínas termolábeis e (IV) proteínas complexas cuja atividade requer associação com moléculas de carboidratos ou lipídeos (Klaenhammer, 1993) e estão apresentadas na Tabela 4. Entretanto, Cotter *et al.* (2005) sugerem uma modificação nessa classificação dividindo as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas em apenas duas categorias: peptídeos que contêm lantionina (Classe I) e peptídeos que não contêm lantionina (classe II), sugerindo uma mudança na denominação das grandes proteínas termolábeis (classe III) que passariam a ser designadas como bacteriolisinas. As bacteriocinas da classe IV não foram incluídas nessa nova classificação, pois, segundo os autores, os membros desta classe ainda não foram apresentados de maneira convincente. A nova classificação, proposta por Cotter *et al.* (2005), pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 4. Classificação das bacteriocinas, adaptado de Cleveland *et al.* (2001).

Classe	Características	Bacteriocinas
I	I_a Lantibióticos, peptídeos pequenos (<5kDa), contendo aminoácidos lantionina e β-metil-lantionina, catiônicos e hidrofílicos com estrutura flexível	Nisina, Lactina 481
	I_b Lantibióticos, peptídeos pequenos (<5kDa), contendo aminoácidos lantionina e β-metil-lantionina, globulares, com estrutura rígida e rede de anéis não carregados ou carregados com carga negativa	Mersacidina
II	II_a peptídeos pequenos (<5kDa), estáveis ao calor, sintetizados através de resíduos de glicina, contendo uma sequência YGNGV-C no N-terminal	Pediocina PA-1, Sakacinas A e P, Leucocina A, carnobacteriocinas, etc.
	II_b Sistema com dois componentes: são necessários dois peptídeos diferentes para formar o sistema ativo de formação de poros	Lactococina G e F, Lactacina F, Plantaricina EF e JK
III	Proteínas grandes (>30kDa) termolábeis	Helveticinas J e V-1829, Acidofilucina A, Lactacinas A e B
IV	Proteínas complexas, atividade da associação de um ou mais grupos funcionais (carboidratos ou fosfolipídeos)	Plantaricina S, Leucocina S, Lactacina 27 e pediocina SJ-1

Tabela 5. Nova classificação das bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, sugerida por Cotter *et al.* (2003).

Classificação	Sugestões	Exemplos
Casse I		
Bacteriocinas que contém lantionina – Lantibióticos	Incluir peptídeos simples e dipeptídeos. Até 11 subclasses podem ser propostas	Nisina, mersacidina, citolisina, etc.
Classe II		
Bacteriocinas que não contém lantionina	Classe heterogênea de pequenos peptídeos	Pediocina PA1, lactacina, enterocina, etc.
Bacteriolisinas		
Consideradas proteínas de lise	Grandes proteínas termolábeis	Lisostafina, enterolisina A

As bacteriocinas inibem as células sensíveis através da formação de poros na membrana, com a interferência na força próton motriz (FPM), no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e no gradiente de pH (ΔpH), resultando no efluxo dos constituintes celulares e privando a célula de sua fonte essencial de energia (Cleveland *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2005; Devlieghere *et al.*, 2004; Montville & Chen, 1998). A força próton motriz controla a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos no interior das células e com o seu colapso ocorre a paralisação de todas as reações que requerem energia, levando à morte celular (McAuliffe *et al.*, 2001). Os lantibióticos

como a nisina dissipam os dois componentes ($\Delta\Psi$ e ΔpH), enquanto as bacteriocinas do grupo II_a como a pediocina PA-1 e a bavaricina MN dissipam completamente o ΔpH e grande parte do $\Delta\Psi$ (Montville & Chen, 1998). Essas alterações ocorrem em dois estágios, o primeiro consiste na adsorção da bacteriocina na membrana celular de uma célula sensível, nesta etapa nenhum dano é causado à célula e a adsorção é reversível. No segundo estágio, a bacteriocina causa alterações letais à célula com danos irreversíveis (Desmazeaud, 1997).

Bacteriocinas são moléculas carregadas positivamente, com regiões hidrofóbicas. As interações eletrostáticas com grupamentos fosfato negativamente carregados contribuem para a ligação inicial das bacteriocinas com a membrana das células sensíveis. Acredita-se que a porção hidrofóbica penetre na membrana formando poros (Cleveland *et al.*, 2001). Porém, a atividade destes compostos está relacionada apenas a bactérias Gram-positivas. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada externa composta por fosfolipídeos, proteínas e lipopolisacarídeos que é impermeável à maioria das moléculas e não admite o acesso de partículas com tamanho superior a 600Da (a menor bacteriocina conhecida possui 3kDa). Entretanto, a presença de outros compostos que provocam a formação de poros na membrana externa de microrganismos Gram-negativos pode permitir a entrada de moléculas maiores, o que seria uma alternativa para a utilização de bacteriocinas nessas células (Abee *et al.*, 1995; Diep & Nes, 2002).

Segundo Montville & Chen (1998), as bacteriocinas inibem a multiplicação de outras bactérias lácticas semelhantes às produtoras da bacteriocina em questão, mas não tem ação sobre si mesmas. As células produtoras de bacteriocinas tornam-se imunes às próprias bacteriocinas através da presença de uma proteína de imunidade específica para a bacteriocina por ela produzida (Nes & Holo, 2000).

Segundo Hanlin *et al.* (1993) e Samelis *et al.* (2005), existem três limitações para o uso de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como conservadores em alimentos: 1- não são ativas contra bactérias patogênicas e deteriorantes Gram-negativas, bolores e leveduras; 2- não são ativas contra todas as células ou esporos de bactérias Gram-positivas; 3- existem variantes de cepas de células sensíveis que são resistentes e podem multiplicar-se na presença de bacteriocinas. Além disso, segundo Aasen *et al.* (2003), os componentes presentes na matriz alimentar desempenham um papel fundamental na eficiência da utilização de bacteriocinas como

conservadores de alimentos uma vez que as bacteriocinas são peptídeos anfifílicos susceptíveis à adsorção por macromoléculas presentes nos alimentos ou ainda à degradação proteolítica.

Vários autores têm pesquisado o potencial antimicrobiano das bacteriocinas demonstrando sua ação contra diversos microrganismos patogênicos em alimentos como leite, iogurte, carne e produtos cárneos. Os resultados obtidos nesses estudos sugerem que as bacteriocinas possuem potencial para utilização na conservação de alimentos (Bromberg *et al.*, 2004; Ghalfi *et al.*, 2006; Grosso & Fávaro-Tindade, 2004; Kruger, 2006; Millette *et al.*, 2006).

2.2.1.1 Bacteriocinas da Classe I

Também denominadas lantibióticos (Cleveland *et al.*, 2001), são peptídeos pequenos (<5kDa) contendo os aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, possuem de 19 até mais de 50 aminoácidos. Segundo Deegan *et al.* (2005) este grupo apresenta duas subclasses, I_a representada por peptídeos alongados, flexíveis e positivamente carregados que atuam formando poros na membrana das células alvo e I_b representada por peptídeos de forma globular, mais rígidos e que apresentam carga negativa ou neutra. Tanto a nisina A quanto a nisina Z são representantes da subclasse I_a. Outros exemplos de bacteriocinas da classe I incluem a lactinina 481 e as bacteriocinas contendo dois aminoácidos lantionina como a citolisina produzida por *Enterococcus faecalis*, lactinina 3147 produzida por *Lactococcus lactis* e estafilococina C55 produzida por *Staphylococcus aureus* (Guinane *et al.*, 2005; McAuliffe *et al.*, 2001). O termo lantibióticos, *lanthionine containing antibiotic*, foi definido pela presença dos aminoácidos tioeter lantionina e/ou β -metil-lantionina no anel intramolecular, incluindo outros resíduos modificados (2,3-dideidroalanina ou Dha e 2,3-didehidrobutirina ou Dhb) na estrutura química destes compostos (Garneau *et al.*, 2002; McAuliffe *et al.*, 2001). A Tabela 6 apresenta uma lista dos lantibióticos conhecidos.

Ainda segundo Garneau *et al.* (2002) e McAuliffe *et al.* (2001), os lantibióticos são sintetizados em duas etapas, sendo que na primeira são produzidos pré-peptídeos que na segunda fase sofrem uma transformação, tornando-se biologicamente ativos. Esses peptídeos não são normalmente encontrados na natureza.

Neste trabalho foi utilizada a bacteriocina nisina, pertencente à classe I, dessa forma foi feita uma revisão mais aprofundada apenas desta classe de bacteriocinas.

Tabela 6. Exemplos de lantibióticos, adaptado de McAuliffe *et al* (2001).

Lantibiótico Tipo A	Microrganismo produtor
Nisina A	<i>Lactococcus lactis</i> NIZOR5, 6F3, NCFB894, ATCC11454
Nisina Z	<i>Lactococcus lactis</i> N8, NIZO22186
Subtilina	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633
Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Tu3298
Gallidermina	<i>Staphylococcus Gallinarum</i> Tu3928
Mutacina B-Ny226	<i>Staphylococcus mutans</i>
Mutacina 1140	<i>Staphylococcus mutans</i> JH1000
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5
Epicidina 280	<i>Staphylococcus epidermidis</i> BN280
Epilancina K7	<i>Staphylococcus epidermidis</i> K7
Lactinina	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ481, ADRIA85LO30
Citolisina	<i>Enterococcus faecalis</i> DS16
Lactocina 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC3147
Stafilococina	<i>Staphylococcus aureus</i> C55
Salvaricina A	<i>Streptococcus salvarius</i> 20P3
Lactocina S	<i>Lactobacillus sake</i> L45
Streptococina A-FF2	<i>Streptococcus pyogenes</i> FF22
Sublancina	<i>Bacillus subtilis</i> 168
Carnocina	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Variacina	<i>Micrococcus varians</i> MCV8
Cipemicina	<i>Streptomyces</i> spp.
Lantibiótico Tipo B	Microrganismo produtor
Cinamicina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Duramicina B	<i>Streptiverticillium</i> spp.
Duramicina C	<i>Streptomyces griseoluteos</i>
Ancovenina	<i>Streptomyces</i> spp.
Mersadicina	<i>Bacillus subtilis</i> HIL Y-85, 54728
Actagardina	<i>Actinoplanes</i>

2.2.1.1.1 Nisina

A nisina é um polipeptídeo produzido por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma espécie de bactéria lática utilizada como cultura *starter*. Foi descoberta em 1928 durante a observação de determinados metabólitos de uma espécie de *Streptococcus lactis* (atualmente reclassificado como *Lactococcus lactis*) que possuíam efeito inibitório sobre outras espécies de bactérias láticas em leite (Delves-Broughton & Gasson, 1994; McAuliffe *et al.*, 2001). Segundo Delves-Broughton & Gasson (1994), a nisina é uma proteína atípica que contém resíduos de aminoácidos incomuns e anéis de lantionina. Esta característica também está presente em outros polipeptídios com atividade antimicrobiana que são produzidos por outras bactérias Gram-positivas e compõem o grupo dos lantibióticos.

O efeito inibitório da nisina abrange um grande número de bactérias Gram-positivas como *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Listeria* spp.. A nisina atua também inibindo células vegetativas ou esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Porém, este lantibiótico não apresenta atividade contra microrganismos Gram-negativos, bolores e leveduras, entretanto, sabe-se que o uso combinado com agentes que modifiquem a permeabilidade da membrana externa dos Gram-negativos pode representar um potencial de utilização da nisina contra estas bactérias (Delves-Broughton & Gasson, 1994; Lauková, 2000; McAuliffe *et al.*, 2001; Pranoto *et al.*, 2005; Samelis *et al.*, 2005).

Embora seu potencial para utilização como conservador em alimentos tenha sido descoberto há bastante tempo, foi apenas em 1988 que o FDA aprovou o uso da nisina em alimentos reconhecendo-a como GRAS, *Generally Regarded as Safe*, (McAuliffe *et al.*, 2001). A aplicação prática da nisina tem sido bastante explorada pela indústria de alimentos devido a suas vantajosas propriedades tais como a resistência a altas temperaturas em baixos valores de pH, além de sua capacidade em prevenir a germinação de esporos bacterianos e o já mencionado efeito contra células vegetativas de Gram-positivos (Delves-Broughton & Gasson, 1994; McAuliffe *et al.*, 2001). Além disso, as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, como a nisina, são naturalmente encontradas nos alimentos, o que contribui para sua aceitação como conservante natural pelos consumidores (Deegan, *et al.*, 2005).

Quanto à estrutura, a nisina consiste de um pequeno polipeptídeo de característica anfifílica, composto por 34 aminoácidos incluindo os resíduos atípicos de dehidroalanina e dehidrobutirina, além dos anéis de lantionina e β -metil-lantionina (Papagianni, 2003). Sua biosíntese ocorre nos ribossomos e envolve uma molécula precursora composta de aminoácidos convencionais, que é convertida em nisina através de reações enzimáticas. Os resíduos de dehidroalanina e dehidrobutirina são resultado da desidratação de resíduos de serina e treonina, respectivamente, enquanto os anéis de lantionina e β -metil-lantionina são formados através da condensação de resíduos de cisteína que se transformam nas moléculas precursoras da nisina. É produzida apenas durante a fase exponencial da multiplicação de *L. lactis* subsp. *lactis*, cessando sua produção quando o microrganismo entra na fase estacionária (Deegan *et al.*, 2005; Delves-Broughton & Gasson, 1994).

Existem duas variantes naturais de nisina, a nisina A e a nisina Z, que diferem apenas no aminoácido da posição 27 (histidina na nisina A e asparagina na nisina Z). Ambas apresentam

atividade antimicrobiana similar, porém, a nisina Z apresenta uma capacidade de difusão superior à da nisina A (Delves-Broughton & Gasson, 1994; Montville & Chen, 1998; Papagianni, 2003). A Figura 1 apresenta a estrutura química da nisina Z.

Figura 1: Estrutura química da nisina Z.

Fonte: <http://www.nature.com/nsmb/journal/v11/n10/images/nsmb830-F1.gif>

Segundo Delves-Broughton & Gasson (1994), a ação bacteriostática e/ou bactericida da nisina é influenciada por sua concentração e pelo nível de células sensíveis a serem atingidas. Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado uma capacidade de inibição na formação da parede celular bacteriana (McAuliffe *et al.*, 2001), o primeiro sítio de ação da nisina é a membrana citoplasmática onde ela atua como agente despolarizador da membrana através de um modelo potencial-dependente. O efeito antibacteriano é decorrente de suas interações com os fosfolipídios que compõem a membrana citoplasmática, que provocam a formação de poros por onde ocorre o efluxo de constituintes citoplasmáticos de baixo peso molecular como ATP, íons de potássio e aminoácidos. O aumento na permeabilidade da membrana provoca o colapso da força próton motriz, ocasionando a rápida parada de todos os processos biosintéticos. Em contraste a este mecanismo, a inibição na formação da parede celular ocorre de forma mais lenta (Delves-Broughton & Gasson, 1994; McAuliffe *et al.*, 2001; Papagianni, 2003).

O grau de associação da nisina com a membrana é altamente dependente do tipo de lipídeos presentes e principalmente da carga destes lipídeos. Como molécula catiônica, a nisina

apresenta maior atividade na presença de alto percentual de moléculas aniônicas ou carregadas negativamente na membrana citoplasmática (Aasen *et al.*, 2003; McAuliffe *et al.*, 2001).

A ação da nisina sobre esporos bacterianos é predominantemente esporostática. Este fator é de extrema importância para sua aplicação em alimentos, uma vez que um teor residual suficiente de nisina deve ser mantido durante toda a vida útil do produto para que se tenha a manutenção da conservação (Delves-Broughton & Gasson, 1994).

Embora a ocorrência de cepas de *L. monocytogenes* resistentes à nisina já tenha sido relatada (Lücke, 2000), o mecanismo de resistência de bactérias à nisina não é bem conhecido. Alguns autores observaram que as cepas resistentes produzem enzimas proteolíticas que degradam a nisina (Brul & Coote, 1999). Outros autores sugerem que as células sensíveis sofrem alterações na membrana citoplasmática, tais como menor rigidez, teores mais baixos de fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol e bifosfatidilgliceril fosfatos (Chi-Zang *et al.*, 2004; Cleveland *et al.*, 2001; McAuliffe *et al.*, 2001; Montville & Chen, 1998). Segundo Song & Richard (1997), o uso de quantidades de nisina abaixo da concentração inibitória pode ocasionar a seleção de microrganismos resistentes.

A utilização de nisina em conjunto com outras tecnologias de preservação ou com outros compostos de potencial antimicrobiano pode ser uma alternativa para a diminuição das concentrações necessárias para o efeito bactericida e/ou bacteriostático e ainda aumentar o espectro antimicrobiano desta bacteriocina (Dykes & Moorhead, 2002; Samelis *et al.*, 2005).

Vários trabalhos já foram realizados avaliando a eficiência da utilização de nisina no controle de *L. monocytogenes*, tanto isoladamente quanto em conjunto com outros compostos antimicrobianos. Bruno *et al.* (1992) observaram que concentrações $\geq 5 \mu\text{g. mL}^{-1}$ dissiparam completamente a força próton motriz em *L. monocytogenes*. Ettayebi *et al.* (2000) observaram uma redução na concentração de nisina necessária para inibir *L. monocytogenes* em meio de cultura líquido, através de seu uso combinado com timol. Já Singh *et al.* (2001) utilizaram nisina em combinação com extrato de alho e também observaram um aumento em seu potencial listericida. Yamazaki *et al.* (2004) pesquisaram a combinação de nisina e ésteres de ácidos graxos (eugenol, carvacrol e timol) contra *L. monocytogenes* em meio de cultura líquido e concluíram que a utilização em conjunto possibilita a diminuição nas concentrações de nisina, reduzindo as chances de seleção de patógenos resistentes.

2.2.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (O.E.s) são fluidos oleosos e aromáticos extraídos de diferentes partes de plantas (flor, caule, folha, fruto, broto, semente, tronco ou raiz), que podem ser obtidos através de diversos processos como destilação, pressão a frio, extração com dióxido de carbono supercrítico e fermentação, sendo a destilação a vapor o método comercialmente mais utilizado. A nomenclatura “óleo essencial” deriva do termo utilizado por Paracelsus von Hohenhein no século 16 que, para se referir ao princípio ativo de drogas e medicamentos, utilizava o termo *quinta essência*. Atualmente são conhecidos aproximadamente 3.000 tipos de O.E.s, sendo que 300 possuem importância econômica principalmente no mercado de flavorizantes e essências. É sabido também que tais compostos apresentam propriedades antimicrobianas, antivirais, antimicóticas, antitoxigênicas, antiparasíticas e inseticidas, possivelmente relacionadas com sua função nas plantas (Burt, 2004).

O principal uso dos O.E.s compreende a indústria alimentícia (como flavorizantes), a indústria de perfumes (fragrâncias) e a indústria farmacêutica (por suas propriedades funcionais). Os componentes individuais do O.E.s também são utilizados como flavorizantes e podem ser extraídos das plantas ou fabricados sinteticamente (Burt, 2004). Embora a destilação a vapor seja o procedimento mais empregado na extração de O.E.s, a utilização de dióxido de carbono líquido à baixa temperatura e alta pressão preserva de forma mais eficiente as características organolépticas desses compostos e essas diferenças influenciam na composição dos O.E.s e em suas propriedades antimicrobianas, porém, o segundo processo é muito mais caro que o primeiro (Burt, 2004).

Um O.E. pode ser formado por mais de sessenta compostos individuais, sendo que o principal componente chega a representar mais 85% do total enquanto os demais se apresentam em pequenas quantidades ou traços. Entretanto, muitas são as variáveis que interferem em sua composição e nas proporções desses compostos, como a época de colheita da planta, a região geográfica, a parte da planta utilizada, o modo de extração e o armazenamento, que se for feito de forma inadequada pode ocasionar perdas nos compostos voláteis. Além disso, O.E.s oriundos de plantas colhidas durante ou imediatamente após o florescimento possuem maior atividade antimicrobiana (Baydar *et al.*, 2004; Burt, 2004).

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana dos O.E.s (Davdison & Naidu, 2000). A Tabela 7 apresenta os principais componentes dos O.E.s mais comumente utilizados em alimentos. Componentes presentes em menores quantidades também desempenham seu papel, provavelmente envolvendo-se em interações sinérgicas com os compostos fenólicos. Considerando-se o grande número de diferentes grupos e compostos químicos presentes nos O.E.s, sugere-se que seu efeito antibacteriano não seja atribuído a um mecanismo específico, mas esteja envolvido com vários alvos nas células sensíveis. Os principais efeitos seriam a degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática, perda de constituintes celulares, coagulação do citoplasma e comprometimento da força próton motriz. Esses mecanismos não funcionam como alvos separados e podem ocorrer uns em consequência dos outros (Brul & Coote, 1999; Burt, 2004).

Segundo Burt (2004), uma importante característica dos O.E.s e seus componentes é o caráter hidrofóbico, que permite que se liguem aos lipídeos da membrana celular modificando sua estrutura e aumentando sua permeabilidade. O efluxo de íons e outros constituintes celulares pode provocar a morte da célula. Geralmente os O.E.s que possuem maior atividade antimicrobiana apresentam maiores concentrações de carvacrol, eugenol e timol, sendo que a estrutura química dos componentes individuais dos O.E.s afeta o seu modo de ação na célula bacteriana.

Muitos estudos que avaliaram a ação dos O.E.s sobre os microrganismos deteriorantes e patogênicos concordam que esses compostos têm maior ação contra bactérias Gram-positivas. Uma possível explicação para a menor suscetibilidade dos organismos Gram-negativos é a presença da membrana externa que restringe a difusão dos compostos hidrofóbicos através dos lipopolissacarídeos (Burt, 2004).

Pouco se conhece sobre os mecanismos de resistência de microrganismos a esses antimicrobianos naturais. Acredita-se que as células se protejam através da liberação de compostos neutros, cátions anfipáticos ou ânions (Brul & Coote, 1999). Ultee *et al.* (2000) observaram que as células de *Bacillus cereus*, submetidas ao tratamento com concentrações subletais de carvacrol, se adaptaram ao antimicrobiano através de alterações nos ácidos graxos que levaram a uma diminuição na fluidez da membrana citoplasmática.

Tabela 7. Principais componentes presentes em O.E. que apresentam potencial antimicrobiano, adaptado de Burt (2004).

Nome vulgar do O.E.	Nome científico da planta	Principais componentes	Composição aproximada (%)
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalol E-2-decanal	70% -
Canela	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldeído	65%
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol Timol γ -terpineno ρ -cymeno	Traços – 80% Traços – 64% 2 – 52% Traços – 52%
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pineno Bornil acetate Canfor 1,8-cineole	2 – 25% 0 – 17% 2 – 14% 3 – 89%
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i> L.	Canfor α -pineno β -pineno 1,8-cineole α -tujone	6 – 15% 4 – 5% 2 – 10% 6 – 14% 20 – 42%
Cravo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol Eugenil acetato	75 – 85% 8 – 15%
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol Carvacrol γ -terpineno ρ -cymeno	10 – 64% 2 – 11% 2 – 31% 10 – 56%

Vários estudos têm sido realizados avaliando o potencial antimicrobiano dos O.E.s. Outtara *et al.* (1997) estudaram o efeito de óleo essencial de canela, cravo, cominho, alho, orégano, pimenta preta, pimenta e alecrim, na superfície de meio de cultura sólido, contra *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta* e *Serratia liquefaciens*, que são os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos. Os óleos de canela, cravo, alecrim, pimenta e alho foram os mais efetivos, apresentando efeito inibitório em concentrações de 1% (v/v) contra todos os microrganismos testados. Os demais óleos testados foram menos eficientes apresentando efeito inibitório apenas em concentrações acima de 10% (v/v). Smith-Palmer *et al.* (1998), utilizando o método de difusão em poços, observaram o efeito de óleos essenciais de louro, canela, cravo, tomilho, laranja, limão, lima, eucalipto, alho, gengibre, cebola, noz-moscada, hortelã, alecrim, sálvia, manjerição, anis e erva-doce contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Campylobacter jejuni*. Os óleos

essenciais de louro, canela, cravo e tomilho apresentaram maior atividade antimicrobiana, com efeito bactericida contra todos os patógenos (exceto *C. jejuni*) em concentrações de 0,075% (v/v).

Segundo Bagamboula *et al.* (2004), os níveis de óleos essenciais e seus compostos utilizados para inibir a multiplicação bacteriana em testes realizados *in vitro* são menores do que aqueles necessários para a inibição em modelos alimentares, devido às interações entre tais componentes e as matrizes alimentares. Entretanto, níveis mais elevados podem influenciar negativamente as propriedades sensoriais originais do alimento (Smith, *et al.*, 2005). Leuschner & Ielsch, (2003) observaram que concentrações de 1% de alho fresco e cravo moído apresentaram efeito bacteriostático e bactericida contra *L. monocytogenes*, respectivamente, em meio de cultura. Porém, quando testadas as mesmas concentrações em queijo tipo *soft*, não foi observada a redução na multiplicação do microrganismo.

Oussalah *et al.* (2006) estudaram o efeito antimicrobiano de um filme à base de alginato acrescido de 1% de óleos essenciais de canela, sálvia ou orégano contra *Salmonella* Typhimurium e *E. coli* O157:H7. Foram adicionadas 10^3 UFC.cm⁻² dos patógenos em toda a superfície da carne que foi recoberta com os filmes. Após cinco dias de estocagem, os óleos essenciais de orégano e sálvia foram mais eficientes contra *Salmonella* Typhimurium, enquanto o óleo essencial de orégano apresentou maior potencial contra *E. coli* O157:H7 em relação aos demais testados.

2.2.2.1 Óleo Essencial de Orégano (O.E.O.)

O orégano (*Origanum*) é uma erva pertencente à família *Lamiaceae* e possui uma grande variedade de espécies (*Origanum vulgare*, *O. marjoram*, *O. dictamnus*, etc.) (Dorman *et al.*, 2003). Os membros da família *Lamiaceae* são relatados como originários da Turquia onde são encontrados em grande variedade, principalmente nas áreas montanhosas do Mediterrâneo. É nessa região que se cultiva a maior parte do orégano comercializado mundialmente, geralmente pertencente às espécies *O. vulgare* ssp. *hirtum* e *O. onites* (Baydar *et al.*, 2004; Kokkini *et al.*, 2004).

Os principais compostos presentes no O.E.O. e que são responsáveis por sua atividade antimicrobiana são o timol (5-metil-2-(1metiletil) fenol) e o carvacrol (2-metil-5-(1metiletil) fenol) que têm como precursores o γ -terpineno (1-metil-4-(metiletil)-1,4-cicloexadieno) e o *p*-cimeno (1-metil-4-(metiletil)-benzeno) respectivamente, sendo que suas concentrações no O.E.O.

são proporcionais aos teores de seus precursores. O timol e o carvacrol possuem estruturas muito similares diferindo apenas na posição da hidroxila no anel fenólico. Ambos atuam aumentando a permeabilidade da membrana celular bacteriana (Burt, 2004). A Figura 2 apresenta a estrutura química de carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno.

Carvacrol

Timol

p-cimeno

γ -terpineno

Figura 2: Estrutura química de carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno

Fonte: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?compound+C06575

O carvacrol e o timol possuem a capacidade de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas, liberando os lipopolisacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. A presença de cloreto de magnésio não apresenta influência nesta reação, descartando a hipótese da ação de agentes quelantes nos cátions da membrana externa (Burt, 2004). Estudos realizados por Ultee *et al.* (2000) concluíram que o carvacrol e o timol podem atuar na força próton motriz e formar poros na membrana citoplasmática através de interações com seus fosfolipídeos, essas conclusões foram obtidas através do estudo do efeito desses compostos contra *Bacillus cereus* onde foi possível observar uma diminuição no $\Delta\Psi$ e uma paralisação completa no ΔpH além da redução no nível de ATP celular.

Ainda segundo Burt (2004), interações sinérgicas entre o O.E.O. e outros compostos como o cloreto de sódio e a nisina podem ocorrer, aumentando o potencial antimicrobiano. Periago & Moezelaar (2001) avaliaram o efeito sinérgico existente entre o carvacrol e a nisina em diferentes temperaturas (8° e 30°C) e pH 7, obtiveram melhores resultados à 30°C indicando que a temperatura possui efeito sobre as mudanças na permeabilidade da membrana citoplasmática.

Ettayebi *et al.* (2000), estudando o potencial antimicrobiano do timol, observaram que esse composto causa o extravasamento de metabólitos intracelulares decorrentes de alterações na estrutura e permeabilidade da membrana e que a adição de nisina resulta na perda imediata de potássio, despolarização da membrana citoplasmática, hidrólise e efluxo parcial de ATP celular.

Segundo Ameida-Doria & Regitano-D'arce (2000) e Zheng & Wang (2001), os terpenos presentes no O.E.O. também possuem importante atividade antioxidante, sendo capazes de doar elétrons aos radicais livres reativos, tornando-os mais estáveis ou não reativos (Dorman *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos estão presentes em diferentes concentrações nos O.E.s, além disso, possuem grande complexidade. Esses dois fatores tornam difícil fazer a comparação da atividade antimicrobiana entre os O.E.s (Manm & Markham, 1998; Zheng & Wang, 2001). A Tabela 8 apresenta outros estudos que avaliaram a atividade antimicrobiana do carvacrol e do timol e a Tabela 9 apresenta os teores de compostos fenólicos detectados em óleos essenciais de orégano.

Tabela 8. Estudos que relataram a atividade antimicrobiana de carvacrol e timol, adaptado de Dorman & Deans (2000).

Cepa	Componente fenólico	Metodologia	Referência
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Bacillus cereus</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Ultee <i>et al.</i> (1998)
<i>Bacillus cereus</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Pol <i>et al.</i> (2002)
<i>Bacillus cereus</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Rajkovic <i>et al.</i> (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em discos	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>Bacillus subtilis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Bacillus circulans</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Rajkovic <i>et al.</i> (2005)
<i>Brevibacterium linens</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Brocothrix thermosphacta</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Candida albicans</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida tropicalis</i>	Carvacrol	Difusão em poços	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Citrobacter freundii</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Clostridium sporogenes</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Erwinia carotovora</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Escherichia coli</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Escherichia coli</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	Carvacrol e timol	Densidade ótica	Helander <i>et al.</i> (1998)
<i>Flavobacterium suaveolens</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Leuconostoc cremosis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Micrococcus luteus</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Moraxella</i> sp.	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Penicillium digitatum</i>	Carvacrol e timol	Densidade ótica	Daferera <i>et al.</i> (2000)
<i>Proteus vulgaris</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carvacrol e timol	Difusão em discos	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carvacrol e timol	Densidade ótica	Lambert <i>et al.</i> (2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Rhizobium leguminosarium</i>	Carvacrol e timol	Difusão em discos	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>Salmonella pullorum</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Carvacrol e timol	Densidade ótica	Helander <i>et al.</i> (1998)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Carvacrol e timol	Difusão em discos	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>Serratia marcescens</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Shigella sonnei</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Bagamboula <i>et al.</i> (2004)
<i>Shigella flexneri</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Bagamboula <i>et al.</i> (2004)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carvacrol e timol	Difusão em discos	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carvacrol e timol	Densidade ótica	Lambert <i>et al.</i> (2001)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Torulopsis glabrata</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman & Deans (2000)

Tabela 9. Proporção de componentes fenólicos em óleo essencial de orégano, adaptado de Burt (2004).

Espécie de <i>Origanum</i>	Carvacrol (%)	Timol (%)	Γ -terpineno	p -cimeno	Referência
Óleo essencial comercial	0,43	31,8	1,31	40,15	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
Óleo essencial comercial	5,19	0,37	0,11	Np	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>O. dictamnus</i>	62,44	0,44	11,41	13,45	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>O. dictamnus</i>	0	78,0	7,9	10,1	Deferera <i>et al.</i> (2000)
<i>O. marjorana</i>	0,2	14,0	0	0	Deferera <i>et al.</i> (2000)
<i>O. microphyllum</i>	0	0,17	13,83	1,36	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>O. onites</i>	59,8	0,5	9,6	7,3	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. onites</i>	71,2	0,4	2,2	6,3	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. onites</i>	68,4	0,2	5,1	5,6	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. onites</i>	54,1	0,2	10,8	13,5	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. scabrum</i>	74,86	4,51	4,66	5,41	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>O. vulgare</i>	79,58	2,45	2,07	8,76	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
<i>O. vulgare</i>	7,8	63,3	12,7	9,9	Deferera <i>et al.</i> (2000)
<i>O. vulgare</i>	2,4	5,6	Np	Np	Milos <i>et al.</i> (2000)
<i>O. vulgare</i>	0	46,84	12,88	6,64	Marino <i>et al.</i> (2001)
<i>O. vulgare</i>	86,9	0,2	3,9	2,9	Baydar <i>et al.</i> (2004)
<i>O. vulgare</i>	2,4	42,8	3,6	37,1	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. vulgare</i>	2,5	30,3	0,6	51,3	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. vulgare</i>	1,7	41,4	2,2	38,7	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. vulgare</i>	67,7	4,1	1,8	17,3	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. vulgare</i>	57,4	0,3	2,7	26,9	Kokkini <i>et al.</i> (2004)
<i>O. vulgare</i>	69,6	0,2	2,8	17,7	Kokkini <i>et al.</i> (2004)

(Np) não foi pesquisado

Devido à presença dos compostos fenólicos acima mencionados, o O.E.O. possui atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (Outtara *et al.*, 1997). Marino *et al.* (2001), observaram que 800ppm de O.E.O. inibiram totalmente a multiplicação de *Escherichia coli* O157:H7, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Micrococcus* sp., *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis* e *Listeria innocua* em meio de cultura líquido. Baydar *et al.* (2004) observaram que a utilização de 2% (v/v) de O.E.O. através da técnica de difusão em poços foi inibitória para *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Corynebacterium xerosis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Listeria monocytogenes*. Caillet & Lacroix (2006) avaliaram o efeito da irradiação gama e da adição de O.E.O. na variação do ATP celular de *Listeria monocytogenes*. As doses de irradiação aplicadas foram 1,2 kGy e 3,5 kGy, com o objetivo de causar danos à célula e morte celular, respectivamente, os níveis de O.E.O. utilizados foram 0,02% e 0,025%. Os estudos foram realizados em meio de cultura e os autores

puderam observar que todos os tratamentos provocaram danos à estrutura da parede celular do microrganismo com redução do ATP intracelular, houve uma correlação significativa entre a redução do ATP intracelular e o aumento do ATP extracelular através da utilização do O.E.O. e o uso combinado com irradiação potencializou o efeito antimicrobiano provocando um aumento na diminuição do ATP intracelular enquanto que a aplicação isolada de irradiação resultou apenas na diminuição do ATP intracelular, sem aumento no ATP extracelular. A Tabela 10 apresenta outros trabalhos realizados para avaliar o potencial antimicrobiano do O.E.O.

Tabela 10. Efeito inibitório de O.E.O. contra diversos microrganismos, adaptado de Burt (2004).

Microrganismo	Óleo essencial de orégano (% - v/v)		Metodologia	Referência
	<i>O. marjoram</i>	<i>O. vulgare</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,25	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Aeromonas sobria</i>	0,25	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Aspergillus niger</i>	Np	15,0	Difusão em agar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Np	10,0	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>Candida albicans</i>	0,25	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Candida rugosa</i>	Np	15,0	Difusão em agar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Np	10,0	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,0	0,25	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Np	10,0	Difusão em ágar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Escherichia coli</i>	Np	1,8	Microdiluição em agar	Moreira <i>et al.</i> (2005)
<i>Escherichia coli</i>	Np	10,0	Difusão em agar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Np	0,062	Difusão em disco	Burt & Reinders (2003)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Np	10,0	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>Lactobacillus sake</i>	Np	10,0	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2,0	2,0	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Np	10,0	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>P. digitatum</i>	0,025	Np	Difusão em disco	Deferera <i>et al.</i> (2000)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Np	0,05	Filé de peixe embalado com atmosfera modif.	Mejlholm & Dalgaard (2002)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Np	0,0025	Meio de cultura líquido	Mejlholm & Dalgaard (2002)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Np	15,0	Difusão em ágar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Np	15,0	Difusão em ágar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Np	10,0	Difusão em ágar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Serratia liquefaciens</i>	Np	10,0	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Outtara <i>et al.</i> (1997)
<i>Serratia marcescens</i>	0,5	0,25	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5	0,12	Difusão em poços	Hammer <i>et al.</i> (1999)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Np	10,0	Difusão em ágar	Özcan & Erkmen (2001)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Np	10,0	Difusão em ágar	Özcan & Erkmen (2001)

(Np) não foi pesquisado

2.3 Interações entre os Antimicrobianos Naturais e os Constituintes da Matriz Alimentar

Vários estudos têm se dedicado a elucidar a conformação estrutural e as propriedades funcionais de compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas e O.E.s. Entretanto, sua aplicação como conservantes alimentares requer estudos que avaliem o impacto das interações entre esses compostos e os ingredientes das matrizes alimentares (Aasen *et al.*, 2003; Deegan *et al.*, 2005).

Segundo Aasen *et al.* (2003), alguns dos fatores que podem influenciar a ação das bacteriocinas nos alimentos incluem as ligações desses compostos com os constituintes da matriz alimentar, resultando em menores teores dos antimicrobianos livres no alimento. Pode ocorrer a ligação do antimicrobiano com os componentes polares e apolares do alimento ou ainda a desestabilização de sua atividade biológica através de degradação proteolítica ou oxidativa. Além disso, as bacteriocinas, por serem peptídeos anfifílicos, ainda podem ser adsorvidas pelas proteínas do alimento por meio de ligações iônicas ou hidrofóbicas.

Estudos realizados por Aasen *et al.* (2003) demonstraram que mais de 80% da sakacina P e nisina adicionadas a amostras de salmão congelado foi rapidamente absorvido pela matriz alimentar, porém, por ser um alimento não tratado termicamente, as enzimas presentes na matriz foram responsáveis por reações proteolíticas resultando na rápida degradação dessas bacteriocinas.

Pol *et al.* (2001), avaliaram a influência da matriz alimentar na inativação de *Bacillus cereus* através da combinação de nisina, carvacrol e tratamento com pulso elétrico em meio de cultura e leite. Observaram que a proteína presente no leite apresentou-se como um fator de limitação do potencial antimicrobiano do carvacrol, neste produto. Smith-Palmer *et al.* (2001) também observaram que maiores teores de proteína diminuíram o efeito antimicrobiano de O.E. de cravo em queijo com baixo teor de gordura.

Segundo Burt (2004) e Mejlhom & Dalgaard (2002), altos teores de gordura diminuem a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, pois estes se dissolvem na fase lipídica do alimento resultando em sua menor disponibilidade para atuação contra os microrganismos dispersos na fase aquosa. A redução na atividade de nisina também já foi observada em alimentos com altos teores de gordura (Davies *et al.*, 1999).

A baixa atividade de água pode diminuir a ação antimicrobiana dos O.E.s, pois dificulta que o mesmo atinja seu alvo nas células sensíveis. Já altos teores de água e /ou sal têm efeito positivo na ação antimicrobiana desses compostos (Skandamis & Nychas, 2000; Smith-Palmer *et al.*, 2001).

O efeito da interferência de NaCl no potencial antibacteriano de peptídeos antimicrobianos como a nisina é variável. Alguns autores comentam que as interações eletrostáticas entre esses peptídeos e alvos negativamente carregados podem ser mascaradas na presença de altas concentrações de sal (Rydlo *et al.*, 2006). Porém outros autores comentam que a adição de NaCl em conjunto com bacteriocinas como nisina e divercina V41 podem resultar em efeito sinérgico ocasionando aumento no potencial antimicrobiano (Lebois, *et al.*, 2004).

Kuwano *et al.* (2005) pesquisando a interferência do cloreto de sódio (NaCl) no potencial antimicrobiano de nisina Z observaram que, interessante, esta bacteriocina apresentou ação contra *Escherichia coli* e que altas concentrações de NaCl interferiram de formas diferentes no potencial antimicrobiano de nizina Z contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados demonstraram uma diminuição na atividade antimicrobiana de nizina Z contra *E. coli*, entretanto, seu potencial antimicrobiano não foi afetado testando-se a mesma concentração de NaCl (100 mM) contra *Staphylococcus aureus*. Segundo os autores, a diminuição da atividade antimicrobiana de nisina em altas concentrações de NaCl pode ser explicada pela ligação entre seus aminoácidos catiônicos e moléculas aniônicas como o sal, porém este mecanismo não está completamente elucidado.

Sabe-se também que é necessário aumentar consideravelmente as concentrações de nisina e O.E.s para se alcançar, em alimentos, o mesmo efeito antimicrobiano apresentado em estudos *in vitro* (Burt, 2004; Kruger, 2006), este fato pode comprometer a aceitação sensorial do produto (Kruger, 2006; Skandamis & Nychas, 2000).

Em estudos realizados por Kruger (2006) sugerem que a matriz alimentar possui forte interferência na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. contra *L monocytogenes* uma vez que seus resultados demonstraram uma redução na contaminação com o microrganismo apenas imediatamente após o contato com os antimicrobianos, não mantendo a mesma redução durante o armazenamento do produto e permitindo a recuperação do patógeno. Esses resultados concordam com o que já foi apresentado por outros autores (Aasen *et al.*, 2003; Deegan *et al.*, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho de mestrado pretendeu avaliar a influência da matriz alimentar no efeito antimicrobiano de O.E.O. e nisina contra *L. monocytogenes*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos ingredientes utilizados na fabricação de lingüiça frescal na ação inibitória do óleo essencial de orégano e nisina sobre *Listeria monocytogenes* neste produto;
- Avaliar a interferência do tempo de contato da nisina e óleo essencial de orégano com os diferentes modelos alimentares, mencionados no item anterior, na ação antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Modelos cárneos

O estudo foi desenvolvido com oito modelos cárneos, preparados com as seguintes formulações (por kg de produto):

A. Formulação completa, correspondente à lingüiça frescal de suíno, contendo:

- Carne moída de pernil de porco: 966,85g;
- Sal: 20,0g;
- Açúcar: 1g;
- Condimentos: 7,0g;
- Sais de cura: 0,145g;
- Emulsificante: 2,5g;
- Antioxidante: 2,5g.

B. Apenas carne moída de pernil de porco (1kg);

C. Carne moída de pernil de porco (980g) + sal (20g);

D. Carne moída de pernil de porco (999,0g) + açúcar (1,0g);

E. Carne moída de pernil de porco (993,0g) + condimentos (7,0g);

F. Carne moída de pernil de porco (999,85g) + sais de cura (0,145g);

G. Carne moída de pernil de porco (997,5g) + emulsificante (2,5g);

H. Carne moída de pernil de porco (997,5) + antioxidante (2,5g).

As quantidades de cada ingrediente empregadas nos modelos foram baseadas na formulação de lingüiça frescal utilizada em estudos anteriores realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos FCF/USP (Liserre *et al.*, 2002).

A massa moída de pernil de porco foi adquirida no comércio de São Paulo, SP, dividida em porções de 1 kg e acondicionada em sacos plásticos. Os condimentos (Condimento Lingüiça 102), o emulsificante (Krakoline E), os sais de cura (Pó Húngaro III) e o antioxidante (Fixador A80S)

foram fornecidos pela empresa Kiesnat & Kratschmer Ltda. (KRAKI, Santo André, Brasil). Foram utilizados ainda NaCl (Sal Cisne, Cabo Frio, Brasil) e açúcar (UNIÃO, São Paulo, Brasil). A carne e os demais ingredientes foram irradiados com uma dose de 10kGy para eliminação da microbiota autóctone, usando uma fonte radioativa de ^{60}Co pertencente ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP. Após a irradiação, a carne foi mantida congelada até o momento do uso e os ingredientes foram armazenados em local seco e ventilado, em temperatura entre 18°C e 25°C.

O Fixador A80S (Kienast & Kratschmer) contém em sua formulação antioxidantes de amplo espectro de ação, principalmente eritorbato de sódio (11,8 a 12,2%), que, combinados com redutores orgânicos especialmente ativos, regulam o pH da massa de carne, atuando como potente antioxidante. O emulsificante Krakoline E (Kienast & Kratschmer) contém tripolifosfato de sódio que mantém a aparência homogênea do produto. O Pó Hungaro III (Kienast & Kratschmer) contém nitratos e nitritos, proporciona a cura rápida e os efeitos de conservação desejáveis. O Condimento Lingüiça 102 (Kienast & Kratschmer) é preparado a partir de uma mistura equilibrada e adequada entre especiarias naturais, óleos essenciais e óleos resinais.

4.1.2 Antimicrobianos naturais

Foram utilizados nisina (Nisaplin, Danisco, Inglaterra) e óleo essencial de orégano (Duas Rodas Industrial Ltda, Brasil), diluídos em etanol 50%, preparado com álcool etílico absoluto PA (Synth, Diadema, Brasil) (Rajkovic *et al.*, 2005).

As concentrações de nisaplin (Danisco) e O.E.O. empregadas, 200 ppm e 0,5% respectivamente, foram determinadas com base em experimentos anteriores realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP (Kruger, 2006).

4.1.3 Cultura microbiana

Foi utilizada a cepa *Listeria monocytogenes* Scott A, pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Até o momento do uso, a cepa foi mantida a -70°C em Caldo

Tryptose Soja, adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Oxoid Ltda, Basingstoke, Inglaterra) (caldo TSBye), acrescido de 20% de glicerina.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da cultura de *L. monocytogenes*

A cultura de *Listeria monocytogenes* foi reativada em caldo TSBye (OXOID) por 18-24h e submetida à centrifugação por 1050 x g por 10 min (centrífuga Mikro 22R, Hettich Zentriugen, Tuttlingen, Alemanha) a 10°C. Após remoção do sobrenadante, o sedimento foi suspenso em água peptonada 0,1% estéril de forma a reconstituir o volume inicial. Os tubos foram agitados e novamente centrifugados, repetindo-se a etapa de lavagem mais duas vezes. O sedimento final, suspenso em água peptonada 0,1%, foi submetido à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1%, sendo um mL de cada diluição transferido para placas de Petri vazias, às quais se adicionou 12-15 mL de Ágar Tryptose Soja, adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAye) (Oxoid Ltda, Basingstoke, Inglaterra). Após homogeneização, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. Em seguida, as placas contendo entre 25 e 250 colônias foram selecionadas, determinando-se o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de suspensão. Os resultados foram expressos em $\log \text{UFC.mL}^{-1}$

4.2.2 Preparo dos modelos cárneos

Para elaboração dos modelos cárneos, a carne congelada foi descongelada a 5°C por aproximadamente 18h, e os ingredientes adicionados de acordo com a formulação pretendida. Para cada modelo cárneo, foram preparados 320g de produto, constituindo dois grupos de 160g: um foi adicionado de 200 ppm de nisaplin (Danisco) e de 0,5% de óleo essencial de orégano, e o outro não foi adicionado desses antimicrobianos (controle) (Kruger, 2006). Em seguida, os produtos foram divididos em porções de 10g e acondicionados em sacos plásticos para amostragem estéreis (Whirl-Pak 1650 mL, NASCO, USA). Os modelos cárneos foram preparados em vasilhas plásticas desinfetadas com álcool 70%. A homogeneização foi feita manualmente, utilizando-se luvas cirúrgicas desinfetadas com álcool 70%. Toda a preparação foi

realizada em capela de fluxo laminar vertical, utilizando-se utensílios esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min ou, quando necessário, por imersão em álcool 70% por 12h.

4.2.3 Avaliação da interferência dos ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial da nisina e óleo essencial de orégano (Figura 3)

4.2.3.1 Contaminação experimental com *L.monocytogenes*

A cultura de *L. monocytogenes*, preparada conforme descrito em 4.2.1, foi submetida à diluição decimal em água peptonada 0,1% até a obtenção de uma suspensão com concentração aproximada de 10^7 UFC.mL⁻¹. O número exato de UFC.mL⁻¹ na suspensão foi determinado através da semeadura em profundidade em TSAye (OXOID) incubação a 37°C por 24h.

Para a contaminação experimental, adicionou-se um mL da suspensão com concentração aproximada de 10^7 UFC.mL⁻¹ a quatro sacos de 10g de cada modelo cárneo contendo 200 ppm de nisaplin (Danisco) e de 0,5% de óleo essencial de orégano e a quatro sacos de 10g de cada modelo cárneo não acrescido de antimicrobianos. Desta forma, cada amostra de 10g atingiu uma contagem inicial de aproximadamente 10^5 – 10^6 UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*. As misturas foram homogeneizadas através de massagem manual dos sacos plásticos por 10 min. Três de cada lote de quatro sacos foram transferidos para um refrigerador a 5°C e o quarto saco do lote foi submetido imediatamente à enumeração de *L. monocytogenes*.

4.2.3.2 Enumeração de *L. monocytogenes*

A enumeração de *L. monocytogenes* nas amostras provenientes dos sacos refrigerados foi feita após 24h, 48h e 72h, empregando-se um saco para cada determinação.

Para enumeração de *L. monocytogenes* homogeneizou-se o conteúdo dos sacos com 90 mL de água peptonada 0,1% empregando-se um homogeneizador de pistões (Stomacher, Seward Medical, Inglaterra) e submeteu-se o homogeneizado à diluição decimal seriada em água peptonada 0,1%. Um mL de cada diluição foi transferido a uma placa de Petri à qual se adicionou 12-15 mL de TSAye (OXOID). Após a solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 35°C por 48h, determinando-se o número de UFC.g⁻¹ de produto. As colônias em TSAye (OXOID)

foram confirmadas como sendo *L. monocytogenes* através da coloração verde-azulada quando observadas sob luz transmitida (ICMSF, 1996). Os resultados foram expressos em log UFC.g⁻¹.

4.2.3.3 Repetições e análise estatística

Os experimentos foram repetidos três vezes. Como resultado de cada experimento, foram consideradas as médias aritméticas das contagens de *L. monocytogenes* obtidas nas três repetições. Para avaliar o efeito dos diferentes ingredientes na ação antilisterial da nisina e óleo essencial de orégano, calculou-se a diferença entre os log UFC.g⁻¹ (Δ log) obtidos nas contagens de cada modelo cárneo adicionado de antimicrobianos e seu respectivo controle (sem adição de nisina e óleo essencial de orégano). Quando as contagens das amostras controle foram superiores às aquelas encontradas nas amostras teste o Δ log foi considerado como inibição na multiplicação do patógeno. Foi feita a comparação entre os Δ log dos diferentes modelos alimentares estudados, ao longo do período de armazenamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Tukey, adotando-se $p < 0,05$. Utilizou-se o programa estatístico Statistica versão 5.5, 1999.

4.2.4 Avaliação da interferência do tempo de contato da nisina e do óleo essencial de orégano com os ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial (Figura 4)

4.2.4.1 Contaminação experimental com *L. monocytogenes*

A contaminação experimental dos oito modelos cárneos com *L. monocytogenes* foi feita no tempo 0h (imediatamente após a preparação dos modelos), e após 2 h, 6h e 12h de preparação dos modelos. Para a contaminação experimental em cada tempo, utilizou-se o mesmo procedimento descrito em 4.2.3.1. Três de cada lote de quatro sacos, para cada um dos quatro tempos avaliados, foram transferidos para um refrigerador a 5°C e o quarto saco do lote foi submetido imediatamente à enumeração de *L. monocytogenes*.

4.2.4.2 Enumeração de *L. monocytogenes*

A enumeração de *L. monocytogenes* foi feita após 0h, 24h, 48h e 72h, empregando-se um saco para cada determinação. O procedimento foi o mesmo descrito em 4.2.3.2.

4.2.4.3 Repetições e análise estatística

Os experimentos foram repetidos três vezes. Como resultado de cada experimento, foram consideradas as médias aritméticas das contagens de *L. monocytogenes* obtidas nas três repetições. Calculou-se a diferença entre os log UFC.g⁻¹ ($\Delta\log$) obtidos nas contagens de cada modelo cárneo adicionado de antimicrobianos e seu respectivo controle (sem adição de nisina e óleo essencial de orégano). Quando as contagens das amostras controle foram superiores àquelas encontradas nas amostras teste o $\Delta\log$ foi considerado como inibição na multiplicação do patógeno. Foi feita a comparação entre os $\Delta\log$ dos diferentes tempos de inoculação com *L. monocytogenes* para um mesmo modelo cárneo, considerando-se também o período de armazenamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Tukey, adotando-se $p < 0,05$. Utilizou-se o programa estatístico Statistica versão 5.5, 1999.

Figura 3. Fluxograma do teste de avaliação da interferência dos ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial de nisina e óleo essencial de orégano.

Figura 4. Fluxograma do teste de avaliação da interferência do tempo de contato da nisina e do óleo essencial de orégano com os ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da interferência dos ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial da nisina e óleo essencial de orégano

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados das contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos oito modelos cárneos estudados, acrescidos e não acrescidos de nisina e O.E.O., após o armazenamento em refrigeração (5°C) por 24h, 48h e 72h, e também nas amostras antes do início do armazenamento (0h). A Tabela 11 apresenta também as diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas em cada um dos modelos cárneos em relação ao modelo cárneo correspondente não adicionado dos antimicrobianos. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética de três repetições. A representação gráfica dos resultados pode ser visualizada nas Figuras 5, 6, 7 e 8 onde estão apresentados os níveis de inibição de *L. monocytogenes* obtidos para cada uma das formulações durante 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento sob refrigeração, respectivamente. Para a melhor visualização do comportamento do microrganismo, em cada um dos modelos cárneos, ao longo de todo o período de armazenamento, a Figura 9 apresenta os resultados obtidos para todas as formulações.

Tabela 11. Contagens de *L. monocytogenes* (log UFC.g⁻¹) nos oito modelos cárneos, com e sem antimicrobianos, após armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Modelos cárneos	Tempo de armazenamento em refrigeração	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> *		Δ log UFC.g ⁻¹	avaliação estatística**
		modelo cárneo com nisina e OEO	modelo cárneo sem nisina e OEO		
Formulação A (carne suína + todos os ingredientes)	0h	3,8	5,5	1,7 ± 0,34	h i
	24h	3,8	5,5	1,7 ± 0,38	h i
	48h	4,3	5,6	1,3 ± 0,45	d e f g h
	72h	4,1	5,8	1,7 ± 0,46	h i
Formulação B (carne suína apenas)	0h	5,3	5,7	0,4 ± 0,37	a
	24h	5,0	5,8	0,8 ± 0,35	a b c d e
	48h	5,1	6,1	1,0 ± 0,29	a b c d e f g
	72h	5,1	6,2	1,1 ± 0,59	c d e f g h
Formulação C (carne suína + sal)	0h	5,1	5,6	0,5 ± 1,00	a b
	24h	4,5	5,7	1,2 ± 0,74	c d e f g h
	48h	4,5	5,6	1,1 ± 0,26	c d e f g h
	72h	4,2	5,9	1,7 ± 0,43	h i
Formulação D (carne suína + açúcar)	0h	5,4	6,1	0,7 ± 0,69	a b c d
	24h	5,7	6,5	0,8 ± 0,62	a b c d e
	48h	4,6	6,0	1,4 ± 0,67	f g h i
	72h	4,7	6,0	1,3 ± 0,71	d e f g h
Formulação E (carne suína + condimentos)	0h	5,4	5,9	0,5 ± 1,03	a b
	24h	5,2	5,7	0,5 ± 0,69	a b
	48h	5,2	5,9	0,7 ± 0,72	a b c
	72h	5,0	6,0	1,0 ± 0,71	a b c d e f g
Formulação F (carne suína + sais de cura)	0h	5,2	6,1	0,9 ± 0,84	a b c d e f
	24h	4,9	6,3	1,4 ± 0,69	e f g h i
	48h	5,0	6,1	1,1 ± 0,75	c d e f g h
	72h	4,7	5,7	1,0 ± 0,89	a b c d e f g
Formulação G (carne suína + emulsificante)	0h	5,0	6,0	1,0 ± 0,91	a b c d e f g
	24h	4,6	5,9	1,3 ± 1,20	e f g h i
	48h	4,6	6,0	1,4 ± 1,20	e f g h i
	72h	4,7	5,7	1,0 ± 1,38	b c d e f g
Formulação H (carne suína + antioxidantes)	0h	5,1	6,1	1,0 ± 0,61	a b c d e f g
	24h	4,4	6,0	1,6 ± 0,72	g h i
	48h	4,6	6,0	1,4 ± 0,37	e f g h i
	72h	4,2	6,1	1,9 ± 0,59	i

* médias de três repetições

** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p > 0,05)

Formulação A (carne suína + todos os ingredientes)
 Formulação B (carne suína apenas)
 Formulação C (carne suína + sal)
 Formulação D (carne suína + açúcar)
 Formulação E (carne suína + condimentos)
 Formulação F (carne suína + sais de cura)
 Formulação G (carne suína + emulsificante)
 Formulação H (carne suína + antioxidantes)

Figura 5. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, antes do início do período de armazenamento.

Formulação A (carne suína + todos os ingredientes)
 Formulação B (carne suína apenas)
 Formulação C (carne suína + sal)
 Formulação D (carne suína + açúcar)
 Formulação E (carne suína + condimentos)
 Formulação F (carne suína + sais de cura)
 Formulação G (carne suína + emulsificante)
 Formulação H (carne suína + antioxidantes)

Figura 6. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, após 24h de armazenamento sob refrigeração (5°C).

Formulação A (carne suína + todos os ingredientes)

Formulação B (carne suína apenas)

Formulação C (carne suína + sal)

Formulação D (carne suína + açúcar)

Formulação E (carne suína + condimentos)

Formulação F (carne suína + sais de cura)

Formulação G (carne suína + emulsificante)

Formulação H (carne suína + antioxidantes)

Figura 7. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, após 48h de armazenamento sob refrigeração (5°C).

Formulação A (carne suína + todos os ingredientes)

Formulação B (carne suína apenas)

Formulação C (carne suína + sal)

Formulação D (carne suína + açúcar)

Formulação E (carne suína + condimentos)

Formulação F (carne suína + sais de cura)

Formulação G (carne suína + emulsificante)

Formulação H (carne suína + antioxidantes)

Figura 8. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, após 72h de armazenamento sob refrigeração (5°C).

Formulação A (carne suína + todos os ingredientes)

Formulação B (carne suína apenas)

Formulação C (carne suína + sal)

Formulação D (carne suína + açúcar)

Formulação E (carne suína + condimentos)

Formulação F (carne suína + sais de cura)

Formulação G (carne suína + emulsificante)

Formulação H (carne suína + antioxidantes)

Figura 9. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas nos diferentes modelos cárneos adicionados de nisina e óleo essencial de orégano e nos correspondentes modelos cárneos não adicionados desses antimicrobianos, durante todo o período de armazenamento sob refrigeração (5°C).

Conforme apresentado na Tabela 11, o uso combinado de 200 ppm de nisaplin (Danisco) e 0,5% de óleo essencial de orégano em todos os modelos cárneos estudados resultou na inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* durante o armazenamento em refrigeração por 72h, confirmado resultados previamente obtidos por Kruger, 2006. No entanto, a intensidade da ação inibitória variou de um modelo cárneo para outro. Uma análise mais detalhada dos resultados apresentados na Tabela 11 e nas Figuras 5, 6, 7, 8 e 9 permite verificar que o modelo cárneo correspondente à formulação completa da lingüiça, adicionado de nisina e óleo essencial de orégano, foi o que resultou em maior diferença nas contagens de *L. monocytogenes* quando comparado ao mesmo modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante todo o período de armazenamento em refrigeração estudado. A diferença média obtida nas contagens nos dois modelos foi de cerca de 1,7 log UFC.g⁻¹ durante todo o período de armazenamento. Interessante observar que essa diferença nas contagens foi obtida já no tempo 0h, e não variou com o tempo de armazenamento, com exceção do tempo 48h onde foi obtida uma diferença de apenas 1,3 log UFC.g⁻¹, porém este valor foi desconsiderado para a

análise dos resultados uma vez que a diferença de 1,7 log UFC.g⁻¹ foi recuperada às 72h de armazenamento.

Resultados diferentes foram obtidos nos demais modelos cárneos. As diferenças médias na contagem de *L. monocytogenes* nos modelos com e sem os antimicrobianos, após o primeiro contato com esses antimicrobianos, foi no máximo 1 log UFC.g⁻¹. No modelo correspondente à carne apenas, a diferença foi a mais baixa de todas observadas (0,4 log UFC.g⁻¹). Para os demais modelos estudados, a presença de sal (formulação C), de açúcar (formulação D), de condimentos (formulação E), de sais de cura (formulação F), de emulsificantes (formulação G), ou de antioxidantes (formulação H) afetou de maneira similar a diferença das contagens de *L. monocytogenes* no tempo 0h. As diferenças nas diferenças médias de contagem não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

Com exceção do modelo carne contendo todos os ingredientes e do modelo carne contendo apenas antioxidantes, nos demais as diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* nos modelos com e sem os antimicrobianos variou de modo similar ao longo do armazenamento até 72h. Os Δ log observados para as formulações C, D, E, F e G não diferiram estatisticamente daquele apresentado para a formulação B ($p > 0,05$).

Os resultados apresentados indicam que a interação de todos os ingredientes usualmente empregados na fabricação de lingüiça frescal foi a que mais contribuiu para o efeito apresentado pelo uso combinado de nisina e O.E.O. Este comportamento pode ser confirmado observando-se as médias de redução da preparação composta apenas por pernil de porco moído, que apresentou as menores reduções na população de *L. monocytogenes* indicando um menor efeito antagônico dos antimicrobianos contra o patógeno nesta preparação. Comparando-se esses dados com resultados obtidos em estudos anteriores realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF/USP (Kruger, 2006), verifica-se que comportamentos semelhantes foram observados testando-se diferentes formulações de lingüiça e seus efeitos na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. no controle de *L. monocytogenes* Scott A neste alimento. Os estudos revelaram que uma maior inibição na multiplicação do patógeno foi obtida quando todos os ingredientes utilizados na formulação base foram empregados em conjunto e que esta redução foi mantida por até 48h de armazenamento sob refrigeração.

A importância das interações entre antimicrobianos utilizados como conservadores alimentares e os constituintes do alimento também já foram citadas por outros autores que avaliaram principalmente o efeito dos teores de gordura e proteína das matrizes na ação dos antimicrobianos e observaram que altos teores protéicos ou de gorduras podem promover uma

proteção dos microrganismos no alimento, reduzindo o potencial dos antimicrobianos (Aasen *et al.*, 2003; Burt, 2004; Deegan *et al.*, 2005; Pol *et al.*, 2001;).

Segundo Burt (2004), essas interações são responsáveis pelos diferentes resultados encontrados nos estudos que avaliam o potencial antimicrobiano de óleos essenciais utilizando metodologias *in vitro* e modelos alimentares.

Pol *et al.* (2001), estudando as influências da matriz alimentar na redução de *Bacillus cereus* por carvacrol, nisina e tratamento com pulso elétrico, relataram que a atividade da nisina foi menor no leite quando comparada à atividade demonstrada em estudos *in vitro* e que o carvacrol não foi capaz de aumentar o efeito sinérgico entre o tratamento com pulso elétrico e a aplicação de nisina no modelo alimentar. Aasen *et al.* (2003) comentam que as ligações entre bacteriocinas e componentes alimentares podem reduzir sua ação antimicrobiana através da redução nas concentrações de bacteriocina livre no alimento. Singh *et al.* (2003) avaliaram a eficiência de óleos essenciais como agentes antimicrobianos contra *L. monocytogenes* em salsichas do tipo *hot dogs* e puderam observar uma redução na atividade antimicrobiana dos óleos essenciais proporcional ao aumento nos níveis de gordura encontrados nas matrizes alimentares. Os autores também realizaram testes *in vitro* e puderam observar maiores índices de inibição de *L. monocytogenes* do que aqueles apresentados para o modelo alimentar, atribuindo essa redução às interações entre os antimicrobianos e os constituintes do alimento. Lin *et al.* (2004) avaliando o potencial antimicrobiano de óleos essenciais contra *L. monocytogenes* em amostras de carne e peixe, também observaram que a presença de proteínas e gorduras nos alimentos pode diminuir a ação dos óleos essenciais por imobilizar os compostos com atividade antimicrobiana. Samelis *et al.* (2005), estudando os efeitos do uso combinado de nisina e ácidos orgânicos ou sais no controle de *L. monocytogenes* em mortadela suína fatiada e armazenada sob refrigeração à 4°C, comentam que a redução do pH através da adição de ácidos orgânicos e a utilização de sais como benzoato e sorbato de potássio, podem contribuir para o aumento da atividade antimicrobiana de nisina contra *L. monocytogenes*, atribuindo ainda ao antimicrobiano um maior efeito na inibição da recuperação do patógeno durante o armazenamento sob refrigeração.

Avaliando-se separadamente o efeito de cada um dos ingredientes testados, temos que a formulação adicionada de antioxidantes foi a que apresentou a maior contribuição positiva para o aumento do efeito antagônico da nisina e do O.E.O. contra *L. monocytogenes*, uma vez que esta preparação foi responsável pelas maiores médias individuais entre os diferentes ingredientes durante o período de armazenamento, apresentando médias de redução superiores a 1,5 ciclos logarítmicos a partir de 24h. Vê-se também que, a partir de 24h de

armazenamento, o modelo adicionado de antioxidantes foi o único que apresentou diferença estatística com relação à formulação preparada sem adição de nenhum dos ingredientes até o final do armazenamento, com exceção do tempo de 48h onde as diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* entre as duas preparações não apresentou diferença estatística, porém a intensidade de inibição na multiplicação do patógeno na formulação H foi recuperada às 72h de armazenamento.

A preparação adicionada de condimentos não apresentou aumento na redução da multiplicação da população microbiana comparada à carne sem adição de nenhum ingrediente, sugerindo que os condimentos não interferiram na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. Estes resultados discordam de estudos anteriores realizados por Kruger (2006), onde contagens superiores de *L. monocytogenes* foram encontradas em amostras de lingüiça frescal preparadas sem a adição de condimentos, sugerindo que estes componentes desempenham papel importante na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. contra *L. monocytogenes*. Porém, as formulações testadas nos estudos de Kruger não levaram em consideração o efeito isolado de cada ingrediente utilizado, sendo que as formulações analisadas sem condimentos também não foram adicionadas de sal. Além disso, a formulação ainda continha outros ingredientes, como antioxidantes, açúcar, emulsificante, etc. Dessa forma, o efeito negativo da ausência de condimentos pode ser atribuído tanto à ausência de sal quanto às interações entre os outros ingredientes e os antimicrobianos.

Nos experimentos de Kruger também foram analisadas preparações de lingüiça frescal adicionadas de todos os ingredientes exceto sal e foi observado um aumento na ação antimicrobiana de nisina e O.E.O. contra *L. monocytogenes* nessas amostras. Porém, a recuperação do patógeno durante o período de armazenamento foi bem superior àquela encontrada nas demais amostras testadas. Estes resultados também diferiram dos encontrados no presente estudo, uma vez que a adição isolada de sal na carne de porco não exerceu ação imediata na atividade antagônica dos antimicrobianos, porém contribuiu positivamente para a inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* em 72h de armazenamento, alcançando níveis de inibição do patógeno similares àqueles encontrados para a formulação completa e também para a formulação adicionada de antioxidantes. Essas diferenças podem mais uma vez ser atribuídas às diferenças entre as preparações testadas nos dois experimentos.

As preparações adicionadas de sais de cura e emulsificante apresentaram um comportamento semelhante, com aumento nas reduções de *L. monocytogenes* às 24h de armazenamento e mantendo estas reduções por até 48h. Porém, alcançando-se 72h de

armazenamento, permitiram a recuperação do patógeno, resultando na diminuição nas médias de redução.

Como já foi mencionado, a preparação adicionada de sal demonstrou um aumento na redução de *L. monocytogenes* apenas às 72h de armazenamento, enquanto a preparação adicionada de açúcar apresentou um aumento na redução da população do patógeno a partir de 48h de armazenamento, mantendo esta redução até o final das 72h.

Estes resultados indicam que os compostos antioxidantes da lingüiça frescal possuem um importante papel na ação antimicrobiana de nisina e O.E.O., sendo responsáveis por um possível aumento na atividade antimicrobiana destes compostos. Uma possível explicação para este fenômeno seria a atuação dos compostos antioxidantes na estabilização de radicais livres que, por possuírem carga negativa, poderiam se ligar aos peptídeos catiônicos presentes na nisina, reduzindo assim a concentração de bacteriocina livre para atuar como agente antimicrobiano.

Pode-se observar também que, comparando-se todos os modelos cárneos estudados, a interação individual de cada ingrediente utilizado na formulação da lingüiça com os antimicrobianos apresentou menor contribuição para a atividade antimicrobiana em relação àquela apresentada pela formulação completa que foi responsável pelo maior efeito positivo na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. contra *L. monocytogenes* neste produto.

5.2 Avaliação da interferência do tempo de contato da nisina e do óleo essencial de orégano com os ingredientes dos modelos cárneos na atividade antilisterial

O efeito das interações entre os constituintes da matriz alimentar e os antimicrobianos utilizados como conservadores também pode sofrer a influência do tempo de contato entre os antimicrobianos e o alimento, potencializando seu efeito antagônico ou ainda reduzindo sua atividade antimicrobiana, portanto fica clara a necessidade de se avaliar tal influência. Porém não foram encontrados estudos que abordassem essas possíveis interações dificultando a discussão dos resultados encontrados neste trabalho para essas influências.

Nessa etapa do trabalho, pretendeu-se verificar a influência do tempo de contato da nisina e do O.E.O. (0h, 2h, 6h e 12h) com a matriz alimentar na atividade antilisterial. A influência de cada um dos ingredientes foi avaliada separadamente (formulações B, C, D, E, F, G e H) e também em conjunto (formulação A). A atividade antilisterial foi mensurada pela contagem de *L. monocytogenes* após 0h, 24h, 48h e 72h de armazenamento em refrigeração (5°C).

Os dados apresentados representam a média aritmética das três repetições realizadas e a inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* foi obtida através da diferença entre as contagens encontradas na amostra controle (sem adição de antimicrobianos) e àquelas encontradas na amostra “teste”.

A Tabela 12 e a Figura 10 apresentam os resultados referentes à formulação A, composta por todos os ingredientes.

Tabela 12. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação A*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	3,8	5,0	1,2 ± 0,12	a b c
	2h	3,4	5,4	2,0 ± 0,23	f g
	6h	3,5	5,2	1,7 ± 0,27	c d e f g
	12h	4,5	6,0	1,5 ± 0,23	a b c d e f
24h	0h	3,9	5,0	1,1 ± 0,47	a b c d
	2h	3,3	5,3	2,0 ± 0,08	e f g
	6h	3,5	5,3	1,8 ± 0,20	d e f g
	12h	4,4	6,1	1,7 ± 0,25	b c d e f g
48h	0h	4,3	5,5	1,2 ± 0,07	a b
	2h	4,2	5,1	0,9 ± 0,02	a
	6h	4,3	5,4	1,1 ± 0,12	a b
	12h	4,5	6,4	1,9 ± 0,08	e f g
72h	0h	4,0	5,7	1,7 ± 0,35	c d e f g
	2h	4,3	5,7	1,4 ± 0,13	a b c d e
	6h	4,3	5,6	1,3 ± 0,23	a b c d e
	12h	4,0	6,3	2,3 ± 0,02	g

* Formulação A: carne + todos os ingredientes

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 10. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação A adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Considerando-se o tempo de contato entre a carne e os antimicrobianos podemos observar uma maior inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* na amostra que permaneceu durante 2h em contato com a nisina e o O.E.O. antes de ser inoculada. Essa redução de aproximadamente 2 log diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) da redução obtida na amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos, porém não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) da amostra que permaneceu 6h em contato com os antimicrobianos antes da inoculação. Estes resultados sugerem que um tempo mínimo de 2 horas foi necessário para que as interações entre todos os ingredientes presentes na formulação base de lingüiça frescal e os antimicrobianos nisina e O.E.O. resultassem num maior efeito entre esses componentes ocasionando uma maior inibição na multiplicação do patógeno. A redução observada na amostra inoculada após 12h de contato entre a carne e os antimicrobianos não se apresentou estatisticamente diferente das observadas nas demais amostras testadas ($p > 0,05$), indicando que o efeito obtido após 12h de contato sofreu um pequeno declínio, porém os antimicrobianos continuaram agindo contra *L. monocytogenes*.

Considerando-se também o tempo de armazenamento sob refrigeração, temos que a redução obtida no primeiro dia de análises foi mantida por até 24h de armazenamento. Já após 48h podemos observar uma recuperação de *L. monocytogenes* para as amostras inoculadas após 2h e 6h de contato com os antimicrobianos, sendo que a redução das contagens nessas amostras tornou-se estatisticamente igual àquela obtida na amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos ($p > 0,05$) enquanto a amostra inoculada após 12h de contato com a nisina e o O.E.O. foi responsável pela maior inibição na multiplicação do microrganismo, diferindo estatisticamente dos demais valores ($p < 0,05$). Esse resultado também foi observado às 72h de armazenamento, com exceção da amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos que, pela primeira vez, apresentou aumento na redução do patógeno. Desta forma sugere-se que, apesar da redução no efeito entre os antimicrobianos e os ingredientes presentes nesta preparação, encontrada no primeiro dia de análises, após 12h de contato entre os mesmos, esta amostra foi a que apresentou menor recuperação de *L. monocytogenes*, indicando uma maior estabilidade nas interações entre os ingredientes adicionados e nisina e O.E.O. durante o armazenamento das amostras sob refrigeração (5°C) por até 72h.

A Tabela 13 e a Figura 11 apresentam os resultados referentes à formulação B, composta apenas por pernil de porco.

Tabela 13. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação B*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L. monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L. monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	4,8	5,7	0,9 ± 0,08	B c d
	2h	5,5	6,0	0,5 ± 0,23	a b c
	6h	5,7	5,8	0,1 ± 0,16	a
	12h	5,3	5,5	0,2 ± 0,45	a b
24h	0h	5,2	6,0	0,8 ± 0,19	B c d
	2h	4,6	5,8	1,2 ± 0,54	d e
	6h	5,4	5,8	0,4 ± 0,13	a b c
	12h	5,1	5,7	0,6 ± 0,05	a b c
48h	0h	4,8	6,2	1,4 ± 0,03	d e
	2h	5,3	6,2	0,9 ± 0,18	B c d
	6h	5,4	6,1	0,7 ± 0,05	a b c d
	12h	4,8	5,9	1,1 ± 0,11	c d e
72h	0h	4,8	6,4	1,6 ± 0,27	e
	2h	5,5	6,4	0,9 ± 0,21	c d e
	6h	5,5	6,4	0,9 ± 0,15	c d e
	12h	4,7	5,8	1,1 ± 0,09	c d e

* Formulação B: apenas carne; ** Média de três repetições;

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 11. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação B adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Comparando-se as amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após diferentes períodos em contato com os antimicrobianos, podemos observar que a maior inibição na multiplicação do microrganismo foi obtida na amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O., porém esta redução de aproximadamente 1 log apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) apenas se comparada à amostra inoculada após 6h de contato com os antimicrobianos. Esta amostra, por sua vez, não apresentou inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* sendo que os valores encontrados para a amostra controle não foram estatisticamente diferentes dos encontrados para a amostra “teste” ($p > 0,05$). Os resultados das amostras inoculadas após 2h e 12h de contato com a nisina e o O.E.O. não foram estatisticamente diferentes dos obtidos nas demais amostras testadas ($p > 0,05$).

Quando observamos também o comportamento das amostras durante o armazenamento sob refrigeração, temos que a amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos manteve os maiores níveis inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* durante todo o período de armazenamento. A amostra inoculada após 2h de contato apresentou um aumento na inibição na multiplicação às 24h de armazenamento, esta

inibição também foi mantida até o final das 72h. A amostra inoculada após 6h de contato com a nisina e o O.E.O. apresentou a menor inibição na multiplicação do microrganismo até 48h de armazenamento, mas com 72h esta inibição foi estatisticamente igual à apresentada pelas demais amostras. A amostra inoculada após 12h de contato com os antimicrobianos apresentou um aumento na inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* a partir 48h de armazenamento e manteve esta inibição até o final das 72h.

Estes resultados sugerem que a inoculação de *L. monocytogenes* imediatamente após a adição de nisina e O.E.O. na carne resultou em um maior efeito antagônico contra o microrganismo e que este efeito foi mantido durante todo o período de armazenamento. Porém, mesmo nas amostras que permaneceram em contato com os antimicrobianos por 2h, 6h e 12h antes de serem inoculadas com o patógeno pode-se observar uma redução na recuperação de *L. monocytogenes* ao longo do tempo de armazenamento, uma vez que as amostras controle apresentaram um aumento na população de *L. monocytogenes* que não foi observado nas amostras “teste”.

A Tabela 14 e a Figura 12 apresentam os resultados referentes à formulação C, composta por carne adicionada de sal.

Tabela 14. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação C*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	Sem nisina e OEO		
0h	0h	4,4	5,8	1,4 ± 0,13	D e f g
	2h	5,5	5,8	0,3 ± 0,05	B
	6h	5,4	5,2	-0,2 ± 0,14	A
	12h	5,3	5,7	0,4 ± 0,18	b
24h	0h	4,2	5,8	1,6 ± 0,11	f g
	2h	4,7	5,8	1,1 ± 0,17	c d
	6h	4,8	5,4	0,6 ± 0,08	b
	12h	4,4	5,8	1,4 ± 0,21	c d e f
48h	0h	4,6	5,7	1,1 ± 0,10	c
	2h	4,7	5,8	1,1 ± 0,20	c d
	6h	4,6	5,7	1,1 ± 0,11	c d
	12h	4,1	5,3	1,2 ± 0,13	c d e
72h	0h	4,1	5,9	1,7 ± 0,09	f g
	2h	4,3	5,8	1,5 ± 0,08	d e f g
	6h	4,3	5,9	1,6 ± 0,17	e f g
	12h	4,1	6,0	1,9 ± 0,07	g

* Formulação C: carne + sal

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p > 0,05).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 12. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação C adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Considerando-se o tempo de contato entre os antimicrobianos e as amostras de carne adicionadas de sal, podemos observar que a amostra inoculada com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos obteve uma maior inibição na multiplicação do patógeno em relação à amostra controle, sendo esta redução de aproximadamente 1,5 log, estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das obtidas nas amostras inoculadas após 2h e 12h de contato com a nisina e o O.E.O. A amostra inoculada após 6h de contato com os antimicrobianos apresentou contagens maiores para a amostra “teste” quando comparada à amostra controle, indicando que não houve efeito dos antimicrobianos na inibição de *L. monocytogenes*. Este resultado sugere que, num primeiro momento, as interações entre o sal e os antimicrobianos adicionados na carne podem ter resultado numa diminuição do efeito antagonico da nisina e do O.E.O. para a *L. monocytogenes* quando estes compostos permaneceram em contato durante um período superior à 2h. Porém se considerarmos também o comportamento do microrganismo nas amostras durante o período de armazenamento, podemos observar um aumento na população do patógeno nas amostras

controle, enquanto que nas amostras teste as contagens permaneceram iguais ou menores que as observadas no primeiro dia de análises. Estes resultados podem indicar que as interações entre o sal, a nisina e o O.E.O. potencializaram o efeito entre os antimicrobianos impedindo a multiplicação do microrganismo durante as 72h de armazenamento sob refrigeração.

A Tabela 15 e a Figura 13 apresentam os resultados referentes à formulação D, composta por carne adicionada de açúcar.

Tabela 15. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação D*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	4,8	6,1	1,3 ± 0,10	d e f
	2h	5,5	6,3	0,8 ± 0,04	b
	6h	5,3	6,1	0,8 ± 0,04	b
	12h	5,8	5,9	0,1 ± 0,07	a
24h	0h	5,6	6,8	1,2 ± 0,02	c d e
	2h	5,8	6,9	1,1 ± 0,05	c d
	6h	5,9	6,6	0,7 ± 0,01	b
	12h	5,5	5,6	0,1 ± 0,13	a
48h	0h	4,5	6,0	1,5 ± 0,10	g h
	2h	4,8	6,2	1,4 ± 0,07	e f g
	6h	4,9	6,1	1,2 ± 0,04	c d e
	12h	4,1	5,7	1,6 ± 0,55	h
72h	0h	4,7	6,2	1,5 ± 0,07	f g h
	2h	4,9	6,1	1,2 ± 0,07	c d e
	6h	4,9	6,0	1,1 ± 0,05	c
	12h	4,2	5,6	1,4 ± 0,15	e f g

* Formulação D: carne + açúcar

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p > 0,05).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 13. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação D adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Observando-se os efeitos do tempo de contato entre as amostras de carne adicionadas de açúcar e os antimicrobianos, temos que a amostra inoculada com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos apresentou a maior inibição na multiplicação do patógeno, sendo que esta inibição de aproximadamente 1,3 log foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) das inibições apresentadas pelas amostras inoculadas após 2h, e 6h de contato com a nisina e o O.E.O. A amostra que permaneceu em contato com os antimicrobianos durante 12h antes de ser inoculada não apresentou inibição na multiplicação de *L. monocytogenes*, uma vez que as contagens da amostra controle não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) daquelas obtidas para a amostra “teste”. Desta forma, pode-se sugerir que as interações entre o açúcar a nisina e o O.E.O. reduziram a atividade antimicrobiana destes compostos quando o tempo de contato entre eles foi superior à 2h, eliminando completamente esta atividade após 12h de contato. Este comportamento foi observado também às 24h de armazenamento sob refrigeração, com exceção da amostra inoculada após 2h de contato com os antimicrobianos, onde houve um aumento na inibição na

multiplicação do patógeno, tornando-se estatisticamente igual ($p > 0,05$) à inibição obtida na amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos. Este fato deveu-se a um aumento nas contagens microbianas da amostra controle, que foi superior àquele observado para a amostra “teste”, indicando que o efeito dos antimicrobianos proporcionou uma menor recuperação da *L. monocytogenes* durante 24h de armazenamento. Já às 48h de armazenamento, pode ser observada uma inibição na multiplicação de *L. monocytogenes*, tanto nas amostras controle quanto nas amostras “teste”, independentemente do tempo de contato prévio das mesmas com os antimicrobianos. Porém esta inibição mostrou-se mais pronunciada nas amostras que continham os antimicrobianos. Outro fator interessante de se observar é que a amostra inoculada 12h após a adição de nisina e O.E.O. apresentou a maior inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* às 48h de armazenamento (comparando-se as amostras “teste” e controle), não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) da amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos e mantendo este comportamento até o período de 72h de armazenamento. Estes resultados podem sugerir que, apesar de causar redução na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. no primeiro dia de análises, as interações entre o açúcar e os antimicrobianos resultaram num efeito antagônico contra *L. monocytogenes* durante o tempo de armazenamento.

A Tabela 16 e a Figura 14 apresentam os resultados referentes à formulação E, composta por carne adicionada de condimentos.

Tabela 16. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação E*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	4,7	5,8	1,1 ± 0,34	b c
	2h	5,5	5,8	0,3 ± 0,08	a b
	6h	5,5	5,8	0,3 ± 0,14	a b c
	12h	5,7	5,8	0,1 ± 0,42	a
24h	0h	5,1	5,7	0,6 ± 0,20	a b c
	2h	5,4	5,9	0,5 ± 0,02	a b c
	6h	5,4	5,7	0,3 ± 0,29	a b c
	12h	5,2	5,7	0,5 ± 0,48	a b c
48h	0h	5,1	5,8	0,7 ± 0,08	a b c
	2h	5,0	5,7	0,7 ± 0,25	a b c
	6h	5,2	5,9	0,7 ± 0,07	a b c
	12h	5,4	5,9	0,5 ± 0,19	a b c
72h	0h	4,9	6,0	1,1 ± 0,42	a b c
	2h	5,4	5,8	0,4 ± 0,21	a b c
	6h	4,9	6,0	1,1 ± 0,61	c
	12h	4,8	5,9	1,1 ± 0,33	b c

* Formulação E: carne + condimentos

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p > 0,05).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 14. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação E adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Quando consideramos o efeito do tempo de contato entre os antimicrobianos e as amostras de carne adicionadas somente de condimentos, podemos observar um maior efeito na inibição na multiplicação microbiana na amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O. Porém, esta inibição de aproximadamente 1 log não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) para aquelas encontradas nas amostras inoculadas após 2h ou 6h de contato com os antimicrobianos. Já a amostra inoculada após permanecer 12h em contato com a nisina e o O.E.O. não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) entre as contagens das amostras “teste” e controle, indicando que não houve efeito antagônico dos antimicrobianos contra *L. monocytogenes* no primeiro dia de análises para esta amostra. Já se considerarmos também o tempo de armazenamento sob refrigeração, temos que às 24h a amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos apresentou recuperação do microrganismo, enquanto que a amostra inoculada após 12h de contato sofreu uma diminuição na população do patógeno. Desta forma, as reduções nas contagens das amostras “teste”, em relação às amostras controle, após 24h e 48h de armazenamento, não apresentaram diferença estatística

para nenhuma das amostras testadas ($p > 0,05$). Às 72h de armazenamento, ocorreu um aumento na inibição da multiplicação encontrada nas amostras inoculadas após 0h, 6h e 12h de contato com os antimicrobianos, porém este aumento não resultou em diferença estatística entre as amostras. Estes resultados indicam que as interações entre os condimentos adicionados à carne e os antimicrobianos resultaram em uma maior atividade antimicrobiana para a amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O., sendo que o efeito antagônico dos mesmos desapareceu após 12h de contato. Porém, ao longo do tempo de armazenamento essas interações pareceram não influenciar os antimicrobianos, uma vez que a inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* apresentada por todas as amostras testadas não apresentou diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

A Tabela 17 e a Figura 15 apresentam os resultados referentes à formulação F, composta por carne adicionada de sais de cura.

Tabela 17. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação F*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	4,9	6,0	1,1 ± 0,09	b c d e
	2h	5,4	6,2	0,8 ± 0,22	a b c d
	6h	5,6	6,1	0,5 ± 0,08	a
	12h	5,1	6,0	0,9 ± 0,12	a b c d
24h	0h	4,7	5,9	1,2 ± 0,56	c d e
	2h	5,1	6,4	1,3 ± 0,05	c d e f
	6h	5,0	6,7	1,7 ± 0,08	f
	12h	4,8	6,0	1,2 ± 0,04	c d e f
48h	0h	4,8	6,1	1,3 ± 0,13	d e f
	2h	5,1	6,2	1,1 ± 0,08	b c d e
	6h	5,2	6,2	1,0 ± 0,25	b c d e
	12h	4,7	5,9	1,2 ± 0,09	c d e
72h	0h	4,6	6,0	1,4 ± 0,34	e f
	2h	5,0	5,9	0,9 ± 0,09	a b c
	6h	5,1	5,8	0,7 ± 0,14	a b
	12h	4,4	5,4	1,0 ± 0,14	b c d

* Formulação F: carne + sais de cura

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 15. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação F adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Considerando-se o tempo de contato entre as amostras de carne adicionadas apenas de sais de cura e os antimicrobianos, pode-se observar que a amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O. apresentou maior inibição na multiplicação de *L. monocytogenes*. Porém, esta inibição de aproximadamente 1 log não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) daquelas apresentadas pelas amostras inoculadas após 2h e 12h de contato com os antimicrobianos. A menor inibição na multiplicação do microrganismo foi observada na amostra que permaneceu 6h em contato com os antimicrobianos antes de ser inoculada. Já se considerarmos também o tempo de armazenamento das amostras sob refrigeração, temos um aumento nas diferenças entre a população de *L. monocytogenes* das amostras “teste” e controle indicando uma diminuição na população do patógeno para todas as amostras adicionadas de antimicrobiano às 24h de armazenamento, seguida de um aumento na população das amostras controle, resultando numa maior inibição do microrganismo na amostra inoculada após 6h de contato com os antimicrobianos. Esta inibição apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) apenas em relação à amostra inoculada imediatamente após a

adição dos antimicrobianos. Porém, este comportamento não foi observado durante o restante do tempo de armazenamento, sendo que após 48h e 72h as contagens das amostras controle também apresentaram redução e novamente a amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos foi a responsável pela maior diferença entre as contagens de *L. monocytogenes* da amostra “teste” em relação à amostra controle. Este resultado indica que os sais de cura contribuem para o efeito antimicrobiano da nisina e do O.E.O. quando as amostras são inoculadas imediatamente após a adição dos antimicrobianos. Sugere-se ainda que os sais de cura possam desempenhar um papel na inibição da multiplicação da população microbiana presente na amostra controle após 48h e 72h de armazenamento, o que não foi acompanhado pelas amostras adicionadas de antimicrobiano.

A Tabela 18 e a Figura 16 apresentam os resultados referentes à formulação G, composta por carne adicionada de emulsificante.

Tabela 18. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação G*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	4,5	5,9	1,4 ± 0,03	b c d
	2h	5,1	6,0	0,9 ± 0,06	b c
	6h	5,1	6,0	0,9 ± 0,41	b c
	12h	5,2	6,0	0,8 ± 0,05	a b
24h	0h	3,9	6,0	2,1 ± 0,09	e
	2h	4,6	6,1	1,5 ± 0,16	c d
	6h	4,9	5,8	0,9 ± 0,07	b c
	12h	4,9	5,8	0,9 ± 0,02	a b
48h	0h	3,8	5,9	2,1 ± 0,18	e
	2h	4,5	5,8	1,3 ± 0,14	b c d
	6h	5,0	6,1	1,1 ± 0,12	b c
	12h	5,1	6,0	0,9 ± 0,10	b c
72h	0h	3,9	5,6	1,7 ± 0,25	d e
	2h	4,4	5,5	1,1 ± 0,13	b c
	6h	5,1	6,1	1,0 ± 0,08	b c
	12h	5,6	5,6	0 ± 0,55	a

* Formulação G: carne + emulsificante

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura16. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação G adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Considerando-se o tempo de contato entre as amostras adicionadas de emulsificante e os antimicrobianos, podemos observar uma maior inibição na multiplicação de *L. monocytogenes* para a amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O. Esta redução de aproximadamente 1,5 log não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$) das demais amostras analisadas no primeiro dia de testes. Porém, se considerarmos também o período de armazenamento, podemos observar uma inibição na multiplicação do patógeno para esta amostra após 24h, 48h e 72h de armazenamento, acompanhada de um aumento nas contagens da amostra controle, resultando em uma maior inibição do microrganismo durante o período de armazenamento. Esta inibição apresentada pela amostra inoculada imediatamente após a adição dos antimicrobianos foi de aproximadamente 2 log e manteve-se como a maior até o final do período de armazenamento, diferindo estatisticamente das demais amostras analisadas ($p < 0,05$). Já as amostras que permaneceram em contato com os antimicrobianos por 2h e 6h antes de serem inoculadas, apresentaram inibições na multiplicação de *L. monocytogenes*

inferiores àquelas encontradas para a amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O. A menor inibição do patógeno foi observada na amostra que permaneceu em contato com os antimicrobianos durante 12h antes da inoculação e às 72h de armazenamento. Esta amostra não apresentou diferença estatística entre as contagens da amostra “teste” e controle, indicando a diminuição do efeito antagônico dos antimicrobianos contra *L. monocytogenes* para esta amostra. Esses resultados sugerem que o efeito antimicrobiano de nisina e O.E.O. pode ser diminuído quando as amostras de carne adicionadas de emulsificante permanecem em contato com antimicrobianos por mais de 2h, sendo este efeito bastante reduzido após 12h de contato e completamente dissipado seguindo-se até 72h de armazenamento.

A Tabela 19 e a Figura 17 apresentam os resultados referentes à formulação H, composta por carne adicionada de antioxidantes.

Tabela 19. Contagens de *L. monocytogenes* no modelo cárneo correspondente à formulação H*, preparado com e sem nisina e O.E.O. adicionado de *L.monocytogenes* 0h, 2h, 6h e 12h após o preparo, após o armazenamento em refrigeração (5°C) por até 72h.

Tempo armazenamento em refrigeração	Tempo da adição de <i>L.monocytogenes</i> após o preparo	Contagens de <i>L.monocytogenes</i> ** (log UFC.g ⁻¹)		Δ log UFC.g ⁻¹	Avaliação estatística***
		Com nisina e OEO	sem nisina e OEO		
0h	0h	5,2	6,0	0,8 ± 0,46	a b c
	2h	5,2	6,1	0,9 ± 0,07	a b
	6h	5,1	6,0	0,9 ± 0,27	a b c
	12h	4,9	5,9	1,0 ± 0,15	a b c
24h	0h	4,5	6,0	1,5 ± 0,30	a b c d
	2h	4,5	6,1	1,6 ± 0,06	a b c d
	6h	4,2	6,0	1,8 ± 0,13	b c d
	12h	4,5	5,9	1,4 ± 0,16	a b c d
48h	0h	5,5	5,9	0,4 ± 0,81	a
	2h	4,4	6,0	1,6 ± 0,22	a b c d
	6h	4,4	5,9	1,5 ± 0,23	a b c d
	12h	4,3	5,8	1,5 ± 0,10	a b c d
72h	0h	4,6	6,2	1,6 ± 0,23	a b c d
	2h	4,1	6,0	1,9 ± 0,12	c d
	6h	4,1	6,2	2,1 ± 0,13	d
	12h	4,2	6,2	2,0 ± 0,24	d

* Formulação H: carne + antioxidantes

** Média de três repetições

*** Valores seguidos da mesma letra minúscula não apresentaram diferença estatística entre si (p > 0,05).

A = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* imediatamente após a adição dos antimicrobianos
 B = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 2 h de contato com os antimicrobianos
 C = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 6 h de contato com os antimicrobianos
 D = amostras inoculadas com *L. monocytogenes* após 12 h de contato com os antimicrobianos

Figura 17. Representação gráfica das diferenças nas contagens de *L. monocytogenes* obtidas no modelo cárneo com a formulação H adicionada de nisina e óleo essencial de orégano e no modelo cárneo sem os antimicrobianos, durante o armazenamento à 5°C por até 72h, nos diferentes tempos de adição da cultura.

Para as preparações compostas por carne adicionada de antioxidantes, podemos observar que o tempo de contato entre as amostras e os antimicrobianos não exerceu influência na inibição da multiplicação de *L. monocytogenes*, uma vez que todas as amostras apresentaram reduções de aproximadamente 1 log, sem apresentar porém, diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$). Se considerarmos também o tempo de armazenamento sob refrigeração, temos uma inibição na multiplicação do patógeno para as amostras “teste”, inibição esta que não foi acompanhada pelas amostras controle, resultando num aumento na inibição da multiplicação do microrganismo às 24h de armazenamento independentemente do tempo de contato prévio entre as amostras e os antimicrobianos. Já com 48h de armazenamento a amostra inoculada imediatamente após a adição de nisina e O.E.O. apresentou uma recuperação de *L. monocytogenes* na amostra “teste” que não foi acompanhada pela amostra controle, resultando na menor inibição do microrganismo observada entre as amostras, porém mais uma vez não foi observada diferença estatística entre as amostras testadas ($p > 0,05$). Para as amostras inoculadas após 2h, 6h e 12h de contato com

os antimicrobianos pode-se observar que durante 48h e 72h de armazenamento as contagens apresentadas pelas amostras “teste” sofreram pequenas reduções enquanto aquelas apresentadas pelas amostras controle mantiveram-se iguais ou demonstraram pequeno aumento, resultando em uma inibição do microrganismo que variou entre 1,5 e 2 log até o final do período de armazenamento sem apresentar diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Esses resultados podem indicar que os antioxidantes adicionados às amostras potencializaram o efeito antimicrobiano de nisina e O.E.O. contra *L. monocytogenes* às 24h de armazenamento e que essas interações não foram influenciadas pelo tempo de contato entre as amostras e os antimicrobianos.

Considerando-se esses resultados pode-se sugerir que, exceto para a formulação adicionada de antioxidantes, o tempo de contato entre a nisina e o O.E.O. e os constituintes da matriz alimentar influenciou a atividade antilisterial destes antimicrobianos, sendo que para as formulações compostas de carne adicionada de apenas um ingrediente o contato prévio superior a 2h provocou redução na atividade antimicrobiana. Já para a formulação completa da lingüiça o contato entre os antimicrobianos e os constituintes da matriz alimentar não provocou queda em sua atividade antilisterial uma vez que a partir de 2h de contato prévio tem-se a potencialização da atividade antimicrobiana. Este fato torna-se interessante quando pensamos na aplicação de nisina e O.E.O. como conservadores alimentares pois demonstra que a atividade antimicrobiana não sofre perdas ao longo da vida útil do produto.

6. CONCLUSÕES

Observando-se os dados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- A nisina e o óleo essencial de orégano utilizados em conjunto inibiram a multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A na lingüiça durante o armazenamento sob refrigeração por até 72h;
- Os ingredientes usualmente utilizados na fabricação de lingüiça frescal de suíno influenciaram na atividade antimicrobiana de nisina e O.E.O. contra *L. monocytogenes* Scott A nos modelos cárneos estudados;
- A interação individual de cada ingrediente utilizado na formulação da lingüiça com os antimicrobianos contribuiu menos para a atividade antimicrobiana quando comparada à interação da formulação completa com esses antimicrobianos;
- Comparando-se todos os modelos compostos por carne adicionada de apenas um ingrediente, a maior atividade antilisterial foi observada no modelo composto de carne adicionada de antioxidantes;
- Exceto para a preparação adicionada de antioxidantes, o tempo de contato prévio entre os antimicrobianos e os componentes da matriz alimentar influenciou na atividade antimicrobiana.
- Para a formulação contendo todos os ingredientes, o tempo de contato prévio de 2h foi o que resultou na maior inibição imediata do patógeno. Por outro lado, o tempo de contato prévio de 12h garantiu um efeito prolongado da atividade antimicrobiana durante o armazenamento da lingüiça. Já para as demais amostras, preparadas com somente um dos ingredientes, a ausência de contato prévio foi a condição onde houve melhor atividade antimicrobiana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASEN, I.M.; MARKUSSEN, S.; MØRETRØ, T.; KATLA, T.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K. Interaction of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.35-43, 2003.

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: mode of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.169-185, 1995.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOUE, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.4168-4170, 2001.

ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, p.197-203, 2000.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.285-293, 1997.

BAGAMBOULA, C.F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thimol, estragol, linalool and *p-Cymene* towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v.21, p.33-42, 2004.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p.169-172, 2004.

BENKERROUM, N.; DAOUDI, A.; HAMRAOUI, T.; GHALFI, H.; THIRY, C. DUROY, M.; EYRART, P.; ROBLAIN, D. 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.

BERSOT, L.S.; LANDGRAF, M.; FRANCO B.D.G.M.; DESTRO, M.T., Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, v.57, p.13-17, 2001.

BOHAYCHUK, V.M.; GENSLER, G.E.; KING, R.K.; MANNINEN, K.I.; SORENSEN, O.; WU, J.T.; STILES, M.E.; MCMULLEN, L.M. Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in edmonton, alberta, Canada. **Journal of Food Protection**, v.69, n.9, p.2176–2182, 2006.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; ZAGANINI, C.L.; DELBONI, R.R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitoru activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.137-144, 2004.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.1-17, 1999.

BRUNO, M.E.C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J.; Depletion of proton motive force by nisin in *Listeria monocytogenes* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.7, p.2255-2259, 1992.

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

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.162-167, 2003.

CAILLET, S.; LACROIX, M. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.69, n.12, p.2961–2969, 2006.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F., Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.131-149, 1999.

CASTELLANO, P.H.; HOLZAPFEL, W.; VIGNOLO, G.M. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. **Food Microbiology**, v.21, p.291–298, 2004.

CHI-ZANG, Y.; YAM, K.L.; CHIKINDAS, M.L. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly release into a both systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.15-22, 2004.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L., Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

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

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; PILOSSIOU, M.G. Gc-ms analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.2576-2581, 2000.

DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-phenols. In: NAIDU, A.S., eds. **Natural Food Antimicrobial Systems**. California: CRC Press, 2000. p.265-294.

DAVIES, E.A.; MILNE, C.F.; BEVIS, H.E.; POTTER, R.W.; HARRIS, J.M.; WILLIAMS, G.C.; THOMAS, L.V.; DELVES-BROUGHTON, J. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. **Journal of Food Protection**, v.62, n.9, p.1004–1010, 1999.

DEEGAN, L.H.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension – A Review. **International Dairy Journal**, v.16, p.1058–1071, 2006.

DELVES-BROUGHTON, J.; GASSON, M.J. Nisin. In: DILLON, V.M.; BOARD, R.G., eds. **Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation**. Wallingford: CAB INTERNATIONAL, 1994. cap.4; p.99-131.

DEMO, M.; OLIVA, M.M.; LÓPEZ, M.L.; ZUNINO, M.P.; ZYGADLO, J.A.; Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. **Pharmaceutical Biology**, v.43 n.2, p.129-139, 2005.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Tecnologia Lactea Latinoamericana**, v.28, n.8, p.38-43, 1997.

DESTRO, M.T.; KABUKI, D.Y.; SERRANO, A.M.; Isolation of *Listeria* species from some brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, p.110-112, 1991.

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

DIEP, D.B.; NES, I.F. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. **Current Drug Targets**, v.3, p.107-122, 2002.

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.

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J. Characterisation of the antioxidant properties of the de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v.83, p.255-262, 2003.

DYKES, G.A.; MOORHEAD, S.M. Combined antimicrobial effect of nisin and a listeriophage against *Listeria monocytogenes* in broth but not in buffer or on raw beef. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.71-81, 2002.

ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.85-106, 2000.

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

FRANCO, B.G.M; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: _____. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Atheneu, 2005. cap. 4; p. 33-81.

GARNEAU, S.; MARTIN, N.I.; VEDERAS, J.C. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochemie**, v.84, p.357-364, 2002.

GHALFI, H.; KOUAKOU, P.; DUROY, M.; DAOUDI, A.; BENKERROUM, N.; THONART, P. Antilisterial bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 as a preservative culture in bacon meat and influence of fat and nitrites on bacteriocins production and activity. **Food Science and Technology International**, v.12, p.325-332, 2006.

GOULD, G.W., Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p.51-64, 1996.

GROSSO, C.R.F; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B.lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.151-156, 2004.

GUERRA, N.P.; PASTRANA, L. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.51-55, 2003.

GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food – A Review **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1316-1325, 2005.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.985-990, 1999.

HANLIN, M.B.; KALCHAYANAND, N.; RAY, P.; RAY, B. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have a greater antibacterial activity. **Journal of Food Protection**, v.56, n.3, p.252-255, 1993.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.-H.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

ICMSF. **Microorganisms in food**. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall, 1996. p.141-147.

Institute of Chemical Research Kyoto University. **GenomeNet**. Disponível em: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?compound+C06575. Acesso em 01 março 2007.

JAY, J.M. Introdução aos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: _____. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.22, p. 454-489.

JAY, J.M. Prevalence of *Listeria spp.* in meat and poultry products. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.209-214, 1996.

KLAENHAMMER, T.D. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.

KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; HANLIDOU, E.; LANARAS, T. Essential oil composition of Greek (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) and Turkish (*O. onites*) oregano: a tool for their distinction. **Journal of essential oil Research**, v.16, p.334-338, 2004.

KRUGER, M.F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. São Paulo, 2006. 70p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

KUWANO, K.; TANAKA, N.; SHIMIZU, T.; NAGATOSHI, K.; NOU, S.; SONOMOTO, K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.396-402, 2005.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.

LAUKOVÁ, A. In vitro treatment of different isolates from cattle dung and pig slurry by nisin. **ACTA Vet. BRNO**, v.69, p.147-151, 2000.

LEUSCHNER, R.G.K.; IELSCH, V. Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in both model systems and soft cheese. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.54, p.127-133, 2003.

LIN, Y.T.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and crawberry phytochemical synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.9, p.5672-5678, 2004.

LISERRE, A.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged brazilian sausage. **Meat Science**, v.61, p.449-455, 2002.

LÜCKE, F-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, p.105-115, 2000.

LUKINMAA, S.; AARNISALO, K.; SUIHKO, K.; SIITONEM, A. Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.562-568, 2004.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, p.187-195, 2001.

MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M., Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of food Microbiology**, v.42, p.119-126, 1998.

MARTINIS, E.C.P.; PÚBLIO, M.R.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z., Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.32-37, 2001.

McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action, **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.285-308, 2001.

MEAD, P.S.; DUNNE, E.F.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; PATRICK, M. HUNTER, S.; SALEHI, E.; MOSTASHARI, F.; CRAIG, A.; MSHAR, P.; BANNERMAN, T.; SAUDERS, B.D.; HAYES, P.; DEWITT, W.; SPARLING, P.; GRIFFIN, P.; MORSE, D.; SLUTSKER, L.; SWAMINATHAN, B. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiol. Infect.**, v.134, p.744–751, 2006.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.27-31, 2002.

MILLETTE, M.; DUPONT, C.; ARCHAMBAULT, D.; LACROIX, M. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, p.1364-5072, 2006.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. CHEMICAL Composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v.71, p.79-83, 2000.

MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: Recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.50, p.511-519, 1998.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; VALLE, C.E. del; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v.38, p.565-570, 2005.

MOUREY, A.; CANILLAC, N., Anti-*Listeria monocytogenes* activity of oil components of conifers. **Food Control**, v.13, p.289-292, 2002.

Nature Publishing Group. **Nature.com.** Disponível em : <http://www.nature.com/nsmb/journal/v11/n10/images/nsmb830-F1.gif>. Acesso em 01 março 2007

NES, I.F., HOLO, H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. **Biopolymers (Peptide Science)**, v.55, p.50–61, 2000.

OUATTARA, B.; SIMARD, R.E.; HOLLEY, R.A.; PIETTE, G.J.-P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.155-162, 1997.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of alginate-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, pg2364–2369, 2006.

ÖZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **Eur. Food Res. Technology**, v.212, p.658-660, 2001.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, v.21, p.465–499, 2003.

PERIAGO, P.M.; 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.; KROMER, J.; SMID, E.J. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.3, p.55-61, 2002.

POL, I.E.; MASTWIJK, H.C.; SLUMP, R.A.; POPA, M.E.; J. SMID, E.J. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v.64, n.7, p.1012–1018, 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.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S.K.; SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v.38, p.859-865, 2005.

RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M.; COURTENS, T.; DEBEVERE, J. 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.

RILEY, M.A.; WERTZ, J.E., Bacteriocin diversity ecological and evolutionary perspectives. **Biochemie**, v.84, p.357-364, 2002.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-20.

RODGERS, S., Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v.12, p.276-284, 2001.

RØRVIK, L.M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D.A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, v.94, n.4, p.633-640, 2003.

RYSER, E.T. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H; eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2. d. New York: Marcel Dekker, 1999. p.299-358.

SAMELIS, J.; BEDIE, G.K.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v.38, p.21-28, 2005.

SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.P.; DUVAL E.H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.3, p.911-916, 2004.

SINGH, A.; SINGH, R.K.; BHUNIA, A.K.; SINGH, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**, v.36, p.787-794, 2003.

SINGH, B.; FALAHEE, M.B.; ADAMS, M.R. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. **Food Microbiology**, v.18, p.133-139, 2001.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.44, p.1202-1205, 1996.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.-J.N. Development and evaluation of a model predicting the Survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1646-1653, 2000.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.118-122, 1998.

SMITH, R.L.; COHEN, S.M.; DOULL, J.; FERON, V.J.; GOODMAN, J.I.; MARNETT, L.J.; PORTOGHESE, P.S.; WADDELL, B.M.; WAGNER, B.M.; HALL, R.L.; HIGLEY, N.A.; LUCAS-GALVIN, C.; ADAMS, T.B. A procedure for the safety evaluation on natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.245-363, 2005.

SONG, H.-J.; RICHARD, J. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. **International Journal of food Microbiology**, v.36, p.155-161, 1997.

ULTEE, A.; GORRIS, L.G.M.; SMID, E.J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogens *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.211-218, 1998.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F.A.; SMID, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives Microbiology**, v.174, p.233-238, 2000.

YAMAZAKI, K.; YAMAMOTO, T.; KAWAI, Y.; INOUE, N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. **Food Microbiology**, v.21, p.283-289, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

ZINK, D.L. The impact of consumer demands and trends on food processing. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.467-469, 1997.

ANEXOS

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP